

Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie
Direktor: Prof. Dr. T. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH,
Standort Marburg



STAT6-abhängige Stimulation des Osteoklasten-Inhibitors Osteoprotegerin in humanen Endothelzellen durch Interleukin-4 und Interleukin-13

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nicola Catherine Gabriele Stein

aus Bremen

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 27. November 2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. L. C. Hofbauer
1. Koreferent:	Frau Prof. Dr. Bauer

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	Seite
ABKÜRZUNGEN	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
1. Einleitung	1
1.1. Regulation des Knochenstoffwechsels	1
1.2. Das Zytokinsystem Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand /Receptor activator of nuclear factor- κ B /Osteoprotegerin	6
1.2.1. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand	7
1.2.2. Receptor activator of nuclear factor- κ B	8
1.2.3. Osteoprotegerin	10
1.3. T _H 2-Zytokine in der Knochen-Homöostase	12
1.4. Interaktionen des skeletalen und des vaskulären Systems	14
1.4.1. Osteoklasten und Endothelzellen	14
1.4.2. Kalzifizierungsprozesse im Gefäßsystem	17
2. Fragestellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1. Zellen	23
3.1.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3. Puffer und Lösungen	26
3.1.4. Geräte	29
3.2. Methoden	31
3.2.1. Zellisolierung	31
3.2.2. Zellkultur der humanen Endothelzellen	32
3.2.3. Stimulation der humanen Endothelzellen	34
3.2.4. RNA-Isolierung aus humanen Endothelzellen	35
3.2.5. Photometrische RNA-Quantifizierung	37

3.2.6.	Northern Blot	37
3.2.7.	Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden	40
3.2.8.	Hybridisierung	41
3.2.9.	Western Blot	43
3.2.10.	Osteoprotegerin-Proteinanalyse	45
3.2.11.	Osteoklasten-Assay	47
3.2.12.	Berechnungen und statistische Auswertungen	50
4.	Ergebnisse	52
4.1.	Analyse der Osteoprotegerin-Produktion in humanen Endothelzellen <i>in vitro</i>	52
4.1.1.	STAT6-abhängige Regulation der Osteoprotegerin-Produktion durch die T _H 2-Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 in humanen Endothelzellen	52
4.1.2.	IL-4-Rezeptor-spezifische Signaltransduktion der IL-4-induzierten STAT6-Aktivierung und OPG-Expressionssteigerung	55
4.1.3.	Hemmung der Signaltransduktion von Interleukin-4 durch spezifische Phospholipase C-Blockade	59
4.2.	Osteoklasten-Assay: <i>In vitro</i>-Modell zur Quantifizierung der Knochenresorption	61
4.2.1.	Direkte Wirkung der T _H 2-Zytokine auf die Osteoklastogenese	62
4.2.2.	Parakrine Modulation der Osteoklastogenese durch Endothelzellen	65
5.	Diskussion	72
	T_H2-Zytokine in der Interaktion von Endothelzellen mit Osteoklasten	72
5.1.	Regulation der endothelialen OPG-Produktion durch Interleukin-4 und Interleukin-13	73
5.2.	Effekte von Interleukin-4 und Interleukin-13 auf den Knochenstoffwechsel	78
5.3.	Modulation des RANKL/RANK/OPG-Systems durch Interleukin-4 und Interleukin-13	81
5.4.	Interaktion von Endothelzellen mit Osteoklasten	83
5.5.	Vaskuläre Kalzifizierungsprozesse	86

5.6.	Effekte von OPG im Gefäßsystem	90
6.	Zusammenfassung	95
7.	Conclusion	97
8.	Literaturverzeichnis	99
9.	Anhang	
9.1.	Patientenaufklärung	VII
9.2.	Einverständniserklärung	VIII
9.3.	Danksagung	IX
9.4.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	X

ABKÜRZUNGEN

ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
BMD	Bone mineral density (Knochendichte)
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serum-Albumin
CASMC	Coronary artery smooth muscle cell(s) (koronar-arterielle glatte Muskelzellen)
Cbfa-1	Core binding factor a1
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
COX	Cyclooxygenase
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat (Diethylpyrocarbonate)
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Immunabsorptions-Assay)
EBCT	Electron beam computed tomography (Elektronenstrahl Computertomographie)
ECGF	Endothelial cell growth factor (Endothelzellen-Wachstumsfaktor)
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (Endothelzellen der humanen Umbilikalvene)
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase (<i>früher</i> : Just another kinase)
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MMP	Matrix Metalloproteinase

MOPS	3-(N-morpholino) Propansulfonsäure
MW	Mittelwert
OSM	Onkostatin M
PTH	Parathormon
mRNA	Messenger ribonucleic acid (vermittelnde Ribonukleinsäure)
NB	Northern Blot
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NNP1	Nukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
OCP	Osteoclast precursor(s)
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
ODAR	Osteoclast differentiation and activation receptor
ODF	Osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
RFU	Released fluorescent units (freigesetzte Fluoreszenz-Einheiten)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecylsulphate
SSC	Standard sodium citrate
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TACE	TNF- α -converting enzyme
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF-receptor
TR-1	TNF receptor-related molecule-1
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Seite

Abb. 1	Knochenhomöostase – Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung	2
Abb. 2	Entwicklung eines funktionsfähigen Osteoklasten	3
Abb. 3	RANK-Signaltransduktion der Osteoklastogenese	5
Abb. 4	Das RANKL/RANK/OPG-System	7
Abb. 5	Das RANKL/OPG-System im Knochen	14
Abb. 6	Stimulation der HUVEC	35
Abb. 7	Ansatz des Osteoklasten-Assays	49
Abb. 8	Dosisabhängige Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel durch IL-4 und IL-13	53
Abb. 9	Dosisabhängige Stimulation der STAT6-Phosphorylierung durch IL-4 und IL-13	54
Abb. 10	Zeitabhängige Stimulation der STAT6-Phosphorylierung durch IL-4 und IL-13	55
Abb. 11	Hemmung der IL-4-induzierten OPG-mRNA-Spiegel durch löslichen IL-4 Rezeptor	56
Abb. 12	Hemmung der IL-4-induzierten OPG-Protein-Sekretion durch Löslichen IL-4 Rezeptor	57
Abb. 13	Hemmung der IL-4-induzierten STAT6-Phosphorylierung durch löslichen IL-4 Rezeptor	58
Abb. 14	IL-4-induzierte STAT6-Phosphorylierung durch die Phospholipase C	60
Abb. 15	Phospholipase C als Komponente der IL-4-induzierten Steigerung der OPG-Proteinsekretion	61
Abb. 16	Osteoklasten-Differenzierung in Abhängigkeit von RANKL	64
Abb. 17	Direkte Effekte von IL-4 und IL-13 auf die Osteoklastenaktivität	65
Abb. 18	Indirekte Hemmung der Osteoklastenaktivität durch IL-4	67
Abb. 19	Indirekte Hemmung der Osteoklastenaktivität durch IL-13	68
Abb. 20	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch endotheliales OPG und Aufhebung dieses Effektes durch einen neutralisierenden OPG-Antikörper	70
Abb. 21	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch HUVEC unter IL-4-Exposition und Minderung dieses Effektes durch einen neutralisierenden OPG-Antikörper.	71
Abb. 22	Ausschnitt aus der IL-4-Signaltransduktion in Endothelzellen	76
Abb. 23	Inhibitoren und Promotoren der vaskulären Kalzifizierung	90

1. Einleitung

1.1. Regulation des Knochenstoffwechsels

Das Skelett ist ein metabolisch hoch aktives Organ, das während der gesamten Lebensdauer einem kontinuierlichen Umbauprozess unterliegt. In einem dynamischen Gleichgewicht werden osteoklastäre Resorption und osteoblastäre Produktion von Knochenmatrix koordiniert. Der ständige Knochenumbau ist notwendig, um einerseits die strukturelle Integrität des Skeletts zu gewährleisten und um andererseits die metabolische Funktion als Kalzium- und Phosphat-Speicher zu erfüllen (Tanaka, 2007; Manolagas, 2000; Roodman, 1996). Knochenumbauvorgänge können durch Veränderungen der mechanischen Belastung, durch Mikrotraumata und durch hormonelle Antwort auf Veränderungen der Kalzium- und Phosphat-Verfügbarkeit moduliert werden (Turner, 1998; Raisz, 2005).

Der Knochenumbau erfolgt in einer komplexen, streng regulierten Abfolge von Resorptions- und Formationsschritten. Initial werden mesenchymale Stammzellen der osteoblastischen Linie durch lokale und systemische Faktoren aktiviert und interagieren mit hämatopoietischen Vorläufern der Osteoklasten. Diese unterlaufen einen Differenzierungsprozess und fusionieren zu großen multinukleären Osteoklasten. Die funktionsfähigen Osteoklasten lagern sich an die Knochenoberfläche an und erfahren eine Konformationsänderung mit Bildung einer sogenannten „ruffled border“. Auf diese Weise schaffen sie einen gegen das Umgebungsmilieu abgegrenzten Raum, der durch Sekretion von Wasserstoff-Ionen angesäuert wird. In dem sauren Milieu werden von den Osteoklasten sezernierte lysosomale Enzyme (z. B. Cathepsin K) aktiv und bauen alle Komponenten der Knochenmatrix, einschließlich des Kollagens ab (Teitelbaum, 2005). Für die Anlagerung der Osteoklasten an den Knochen sind spezifische Veränderungen der „lining“-Zellen der Knochenoberfläche notwendig. Diese kontrahieren und sezernieren proteolytische Enzyme zur Freilegung der mineralisierten Oberfläche. In den durch die osteoklastäre Resorption entstandenen Resorptionslakunen lagern sich zunächst mononukleäre Zellen auf der Knochenoberfläche an, die möglicherweise den Resorptionsprozess

vervollständigen und die Knochenbildung durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren initiieren (Raisz, 2005). Mesenchymale Stammzellen wandern ein und differenzieren zu funktionsfähigen Osteoblasten. Nach ihrer Differenzierung beginnen diese mit der Deponierung extrazellulärer Matrix in die Resorptionslakunen, die durch Mineralisierung in vollwertiges Knochengewebe umgewandelt wird (Manolagas, 2000). Während dieses Prozesses differenzieren einige der Osteoblasten zu Osteozyten und werden in der Knochenmatrix eingebettet, wo sie künftig als Mechanosensoren fungieren. Einige der an der Oberfläche befindlichen Osteoblasten wandeln sich in flache „lining“-Zellen um, weitere unterliegen der Apoptose (Raisz, 2005; Jilka et al., 1998) (Abb. 1).

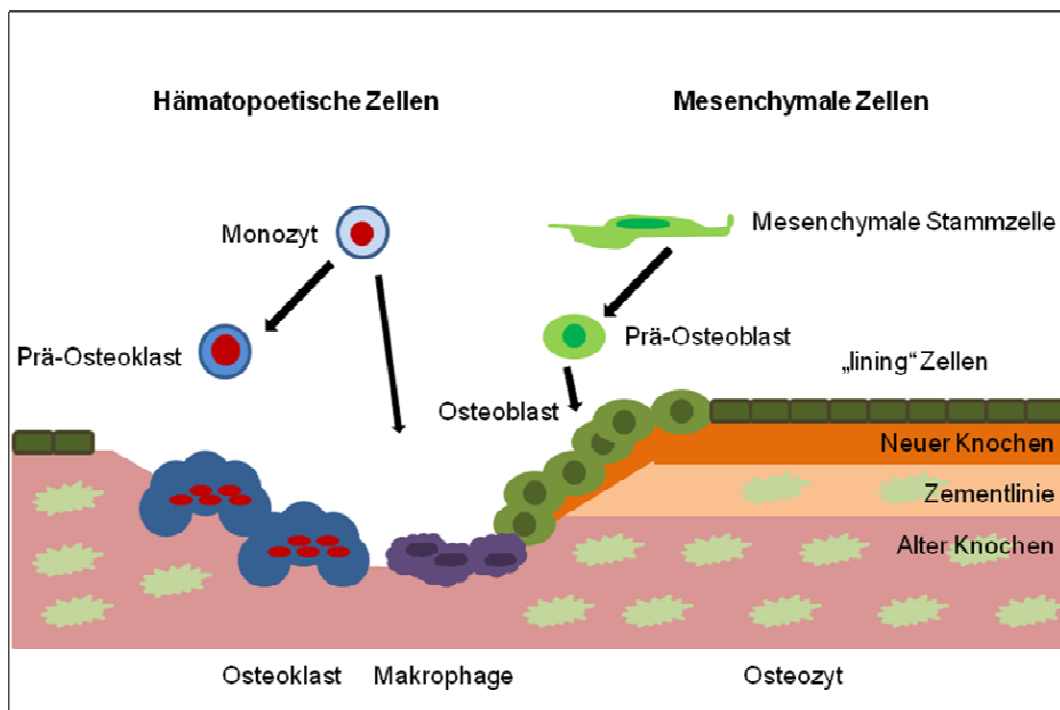


Abb. 1: Knochenhomöostase – Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung: Hämatopoietische Monozyten differenzieren zu Osteoklasten, die den bestehenden Knochen resorbieren. Ebenfalls von Monozyten abstammende Makrophagen initiieren die Knochenbildung und einwandernde mesenchymalen Stammzellen differenzieren zu Osteoblasten. Die Osteoblasten deponieren Knochenmatrix in Resorptionslakunen. Bei der Mineralisierung der Matrix zu neuem Knochengewebe werden die Osteozyten eingemauert. An der Knochenoberfläche differenzieren Osteoblasten zu „lining“-Zellen.

Die Resorptionsphase ist mit einer Dauer von 2-4 Wochen wesentlich kürzer, als die Knochenneubildung (4-6 Monate). Um die Integrität des Skeletts zu wahren, bedarf es daher vor allem einer strengen Regulation der Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten, zumal diese auch als Initiatoren des Knochenumbauzyklus gelten (Tanaka, 2007). Die für die Osteoklastogenese essentiellen Zytokine sind Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) und Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), die unter anderem von Zellen des Knochengewebes produziert werden (Abb. 2). Das RANKL/RANK/OPG-Zytokinsystem gilt somit als zentrales molekulares Regulationssystem des Knochenstoffwechsels.

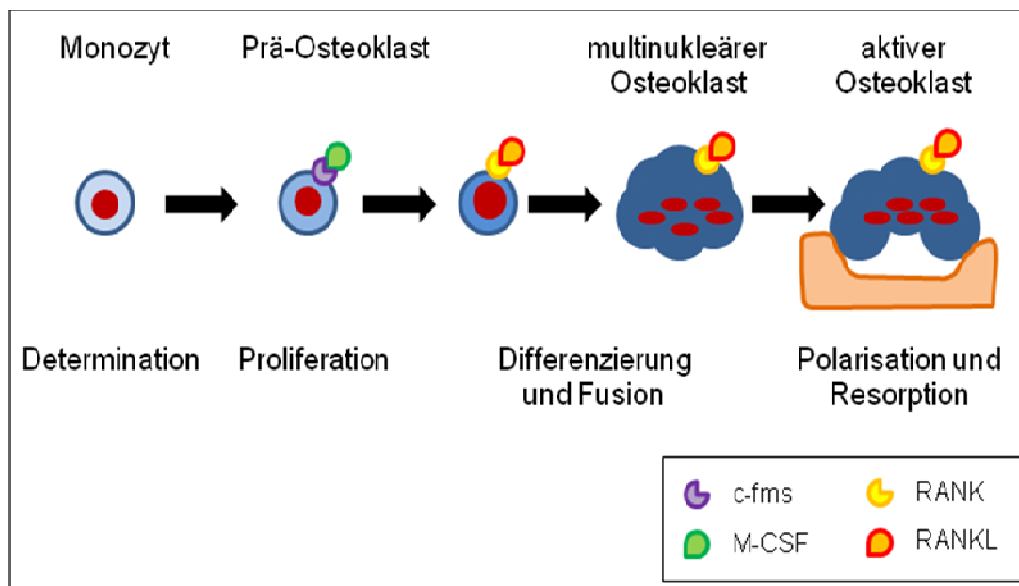


Abb. 2: Entwicklung eines funktionsfähigen Osteoklasten. In der monozytären /makrophagozytären Vorläuferzelle wird durch PU.1 die Expression von c-fms, dem Rezeptor für M-CSF induziert. M-CSF fördert die Proliferation und das Überleben der osteoklastären Vorläuferzellen und wirkt permissiv für RANKL. RANK befindet sich auf Prä-Osteoklasten und Osteoklasten. Seine Aktivierung ist notwendig für die Differenzierung, Fusion, Aktivierung und das Überleben reifer Osteoklasten. Osteoklasten können erst Knochen resorbieren, nachdem die Polarisation durch Kontakt mit Knochengewebe sowie eine Umstrukturierung ihres Zytoskeletts erfolgt ist (Teitelbaum, 2000; Raisz, 2005).

Die auf die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK folgende intrazelluläre Signaltransduktion ist komplex. Eine Stimulation von RANK durch

RANKL führt zu einer Rezeptortrimerisierung und der Rekrutierung von Adaptermolekülen wie der Tyrosinkinase c-src und TNF-receptor associated factors (TRAFs). Insgesamt gibt es sechs TRAFs, von denen TRAF6 eine entscheidende Rolle für die RANKL/RANK-Signaltransduktion zu spielen scheint (Darnay et al., 1999; Galibert et al., 1998; Wong et al., 1999a).

Die Induktion der Genexpression in Osteoklastenvorläufern zur Differenzierung in aktiv resorbierende Osteoklasten erfolgt über die Aktivierung von NF- κ B durch den I κ B-Kinase Komplex (IKK) und über den Nuclear factor of activated T-cells 2 (NFAT2). Die NFAT2-Genexpression wird über die TRAF6-abhängige Aktivierung der c-jun N-terminalen Kinase (JNK)/c-fos/c-jun-Signaltransduktionskaskade und den durch Calcineurin aktivierten NFAT1c induziert (Teitelbaum, 2005; Doherty et al., 2004, Franzoso et al., 1997, Ogawa et al., 2006; Ikeda et al., 2006; Matsuo et al., 2000; Darnay et al., 1998). Die Steigerung des intrazellulären Kalziums mit nachfolgender Aktivierung von Calcineurin zählt zu den wichtigsten intrazellulären Effekten der RANKL-RANK-Interaktion (Teitelbaum, 2005). Die Aktivierung von NFAT1c erfolgt neben Calcineurin über die kostimulationische Signaltransduktionskaskade ITAM/Fc γ /DAP12 (Immuno-receptor tyrosine-based activation motif/Fc receptor common γ subunit /DNAX-activation protein 12 kDa) (Asagiri et al., 2007). Anti-apoptotische und zytoskeletale Effekte von RANKL werden über die TRAF6/c-src-abhängige Induktion der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K)/Akt/PKB-Signaltransduktionskaskade vermittelt (Wong et al., 1998, 1999; Chaisson et al., 2004; Matsubara et al., 2006; Lee et al., 2002; Wang et al., 2004; Harvey et al., 2007). Diese Signaltransduktionskaskade kann auch durch M-CSF induziert werden (Teitelbaum, 2005). Weitere an der zellulären Osteoklastendifferenzierung beteiligte intrazelluläre Signalmoleküle sind Mitogen activated protein (MAP)-Kinasen, AP-1 (Lomaga et al., 1999), sowie PU.1, das die Expression des M-CSF-Rezeptors und die ERK1/2-Signaltransduktionskaskade induziert (Teitelbaum et al., 2005; Takayanagi, 2005; Anderson et al., 1999; Zhao et al., 2007) (Abb.3).

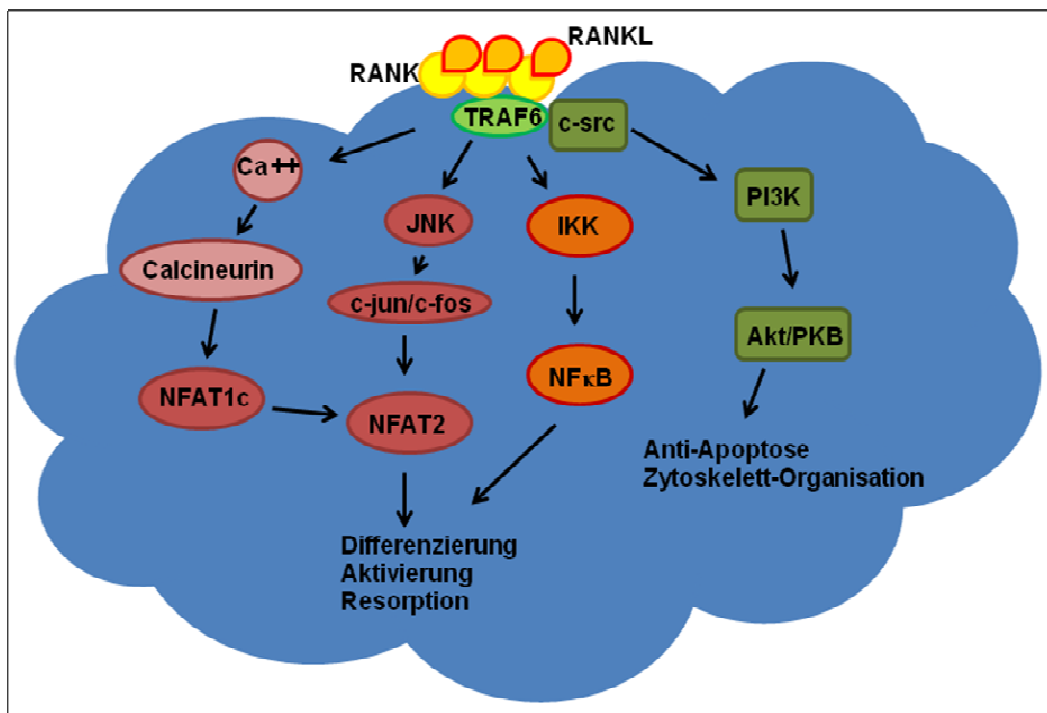


Abb. 3: RANK-Signaltransduktion der Osteoklastogenese: Die durch die RANKL-Bindung initiierte Rezeptortrimerisierung führt zur Rekrutierung von Adaptermolekülen wie c-src und TNF-rezeptor associated factor 6 (TRAF6). Die Signaltransduktion besitzt vier definierte Signalwege. Die Aktivierung von NFAT2 über Calcineurin und die JNK/c-fos/c-jun-Kaskade und die Aktivierung von NF-κB erwiesen sich als essentiell für die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung. Über eine gemeinsame Rekrutierung von TRAF6 und c-src wird die PI3K/Akt/PKB-Signaltransduktionskaskade aktiviert, die antiapoptotische und zytoskeletale Effekte vermittelt.

Während die permanente und kontrollierte Knochenresorption für physiologische Prozesse wie Knochenwachstum, Zahneruption und für die Knochenheilung nach Traumatisierung notwendig ist, führt eine inadäquat hohe Knochenresorption durch gesteigerte Osteoklastenaktivität zu einem Verlust von Knochenmasse. Dieser übermäßige Prozess bildet die Grundlage der Osteoporose und des Morbus Paget sowie der inflammatorischen Osteolyse bei rheumatoider Arthritis und Peridontitis. Ein Mangel an funktionsfähigen Osteoklasten führt dagegen zu einer ungebremsten Mineralisierung mit verdichteter Knochenmasse im Sinne einer Osteopetrose (Teitelbaum, 2000).

1.2. Das Zytokinsystem Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand /Receptor activator of nuclear factor- κ B /Osteoprotegerin

Das Zytokinsystem bestehend aus dem Mitglied der Tumor necrosis factor (TNF)-Ligandenfamilie „Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand“ (RANKL, synonym OPGL, ODF, TRANCE) (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998a; Wong et al., 1997; Anderson et al., 1997), seinem Rezeptor „Receptor activator of nuclear factor- κ B“ (RANK, synonym ODAR) (Anderson et al., 1997) und seinem löslichen Rezeptorantagonisten Osteoprotegerin (OPG, synonym OCIF, TR1) (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998b; Kwon et al., 1998; Tan et al., 1997) stellt ein für die Knochenzellbiologie und Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase und Regulation von Immunfunktionen essentielles Zytokinsystem dar (Teitelbaum, 2000; Kong et al., 2000; Schoppet et al., 2007). Verschiedene Studien vermuten eine entscheidende Beteiligung dieses Zytokinsystems ebenso an der Homöostase des vaskulären Systems, in dem die Faktoren exprimiert werden (Golledge et al., 2004; Dhore et al., 2001; Collin-Osdoby et al., 2001; Zannettino et al., 2005). RANKL fördert die Knochenresorption durch Steigerung der Anzahl und Aktivität funktionsfähiger Osteoklasten über Aktivierung seines osteoklastären Rezeptors RANK (Li et al., 2000). Dieser Prozess wird durch seinen löslichen Antagonisten OPG inhibiert. Somit stellen RANKL und OPG essentielle Faktoren der Regulation von Differenzierung, Fusion, Aktivierung und Apoptose von Osteoklasten dar (Suda et al., 1999; Hofbauer et al., 2000; Wong et al., 1999b; Nakamichi et al., 2007; Gardner et al., 2007) (Abb. 4).

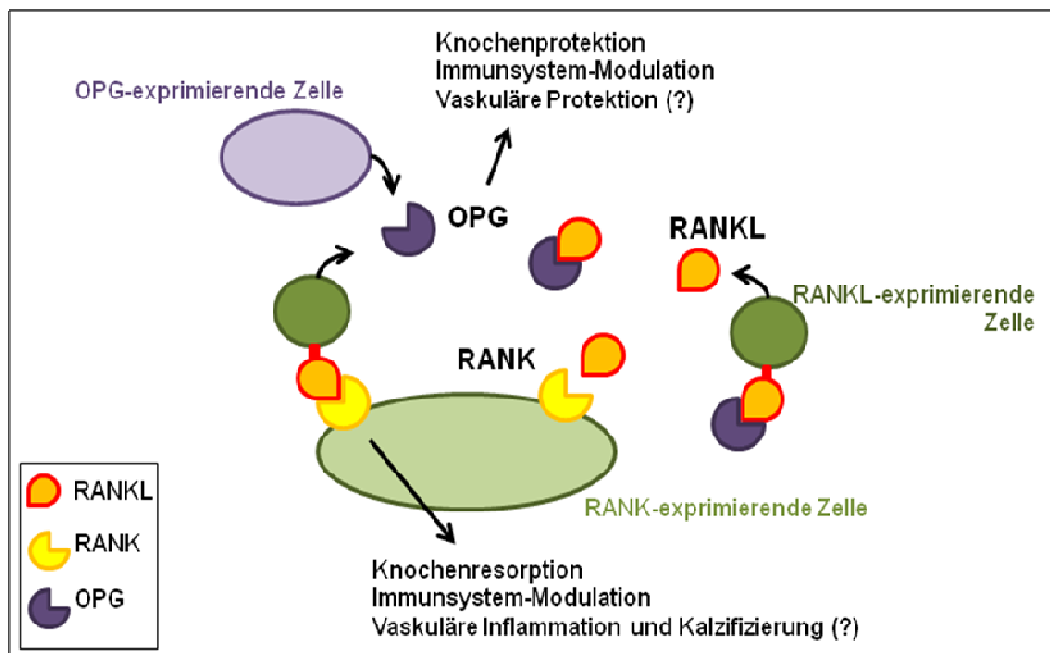


Abb. 4: Das RANKL/RANK/OPG-System. Die Komponenten des RANKL/RANK/OPG-Systems werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert (siehe nachfolgende Kapitel). RANKL bindet in löslicher oder zellgebundener Form an seinen Rezeptor RANK und fördert dadurch die Knochenresorption. OPG agiert als neutralisierender löslicher Rezeptor von RANKL und antagonisiert so dessen Effekte, was u.a. einen übermäßigen Abbau von Knochenmasse verhindert. Neben der Knochenhomöostase regulieren diese Zytokine auch Immunfunktionen und scheinen eine Rolle in der vaskulären Homöostase zu spielen, wobei hier OPG als protektiver Faktor vermutet wird.

1.2.1. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

Erstmals wurde RANKL (Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) (Anderson et al., 1997) bzw. TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) (Wong et al., 1997) im Jahre 1997 als wichtiges immunologisches Zytokin beschrieben. Ein Jahr später identifizierten Lacey et al. und Yasuda et al. dieses Zytokin als spezifischen Liganden von OPG. Eine revidierte Nomenklatur legte die Bezeichnung RANKL für diesen Faktor fest (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

RANKL wird vor allem in Knochen und Knochenmark von verschiedenen skeletalen Zellen wie mesenchymalen Stammzellen, Stromazellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Periostzellen und Chondrozyten exprimiert. Eine sehr hohe

RANKL-Expression findet sich auch im lymphatischen Gewebe und bei verschiedenen Malignomen (Anderson et al., 1997; Kartsogiannis et al., 1999; Lacey et al., 1998; Horwood et al., 1998; Wong et al., 1997a; Yasuda et al., 1998b; Xu et al., 2000; Zhang et al., 2001). Andere nicht-skeletale Zellen mit nachgewiesener RANKL-Expression sind Endothelzellen (Collin-Osdoby et al., 2001), T-Lymphozyten (Josien et al., 1999; Kong et al., 1999b), mesenchymale und epitheliale Zellen des Zahnhalteapparates (Rani et al., 2000), synoviale Fibroblasten (Nakano et al., 2004), monozytäre Zellen (Seta et al., 2008) und verschiedene Tumorzellen (Nagai et al., 2000; Zhang et al., 2001; Fiumara et al., 2001). Die Konzentration an zirkulierendem RANKL wird jedoch hauptsächlich durch den aus dem Knochen freigesetzten Anteil bestimmt (Nakamichi et al., 2007).

Beim Menschen ist das RANKL-Gen auf Chromosom 13q14 lokalisiert. Aufgrund unterschiedlicher Polyadenylierungssignale ist die RANKL-mRNA zwischen 2,2 und 2,4 kb lang (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997a). Kodaira et al. (1999) beschrieben beim RANKL-Gen der Maus fünf Exons, die sich über 40 kb des Maus-Genoms verteilen. Im RANKL-Genpromotor wurden Bindungsstellen für Vitamin D und Glukokortikoide (Kitazawa et al., 1999; Kodaira et al., 1999) sowie für cbfa-1, einen Osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktor (Gao et al., 1998) nachgewiesen. Eine Analyse muriner Zellen zeigte die Existenz drei verschiedener RANKL-Proteinisoformen, eine klassische Membran-gebundene Form, eine vorwiegend am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Form und eine lösliche Form ohne Transmembranregion (Ikeda et al., 2001). Das klassische membrangebundene RANKL-Protein, bestehend aus 317 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, weist eine hohe Sequenzhomologie zu anderen TNF-Liganden wie TRAIL, CD40-Ligand und Fas-Ligand auf (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998; Wong et al., 1997a). Diese RANKL-Form wird posttranslational durch eine TNF-α-converting-enzyme (TACE)-ähnliche Protease an den AS 140 und AS 145 in kürzere Ektodomänvarianten mit ähnlicher Aktivität gespalten (Lum et al., 1999). Die primär sezernierte Form des RANKL-Proteins wurde z.B. in aktivierten T-Lymphozyten (Kong et al., 1999b) und in einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (Nagai et al., 2000) nachgewiesen.

1.2.2. Receptor activator of nuclear factor- κ B

RANK (Receptor activator of nuclear factor- κ B) wurde gemeinsam mit seinem spezifischen Liganden RANKL erstmals 1997 von Anderson et al. beschrieben. Die Namensgebung orientierte sich an NF- κ B (Nuclear factor- κ B), einem seiner intrazellulären Transkriptionsfaktoren. Ein Jahr später wurde RANK erstmals im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel beschrieben (Nakagawa et al., 1998) und erhielt unter anderem die Bezeichnung „Osteoclast differentiation and activation receptor“ (ODAR) (Hsu et al., 1999). Nach Beschluss der Konsensuskommission wird der Begriff RANK verwendet (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000)

RANK wird am stärksten im Knochengewebe und im lymphatischen System exprimiert und findet sich in funktionell aktiver Form vor allem auf Osteoklasten, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten und Fibroblasten (Anderson et al., 1997; Green et al., 1999; Hsu et al., 1999; Myers et al., 1999; Nakagawa et al., 1998) sowie auf Endothelzellen (Min et al., 2003), glatten Muskelzellen (Zhang et al., 2002) und malignen Zellen (Fiumara et al., 2001). Ebenso wie der M-CSF-Rezeptor c-fms und der Kalzitoningrezeptor wurde RANK auch als Oberflächenmarker zur Phänotypisierung von Osteoklasten etabliert (Arai et al., 1999; Yamane et al., 2000).

Beim Menschen befindet sich das RANK-Gen auf dem Chromosom 18q22.1. Die humane RANK-mRNA ist 4,5 kb lang, die der Maus 5,5 kb. Aufgrund verschiedener Polyadenylierungssignale gibt es neben der Hauptform beim Menschen noch weitere Formen, die 3,0 kb, 3,5 kb und 5,5 kb lang sind (Anderson et al., 1997; Nakagawa et al., 1998). Eine konstitutive Aktivierung des RANK-Gens durch Insertionsmutationen im Exon 1 wurde im Zusammenhang mit hereditären Osteopathien beschrieben (Hughes et al., 2000). Zwei Polymorphismen des RANK-Gens (+34863G > A und +35928insdelC) werden als mögliche genetische Faktoren einer geringen Knochendichte (BMD) bei postmenopausalen Frauen vermutet (Koh et al., 2007). Das humane membranständige RANK-Polypeptid besteht aus 616 Aminosäuren und hat Sequenzhomologien zu CD27 und CD40. Eine lange C-terminale intrazelluläre Domäne (383 AS) ermöglicht die Signaltransduktion. Cystein-reiche

extrazelluläre Domänen zeigen die Zugehörigkeit zur Familie der TNF-Rezeptoren (Anderson et al., 1997; Simonet et al., 1997).

1.2.3. Osteoprotegerin

Zwei unabhängige Gruppen identifizierten Osteoprotegerin (OPG; Simonet et al.) bzw. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF, Tsuda et al. 1997; Yasuda et al., 1998a) erstmals 1997 als ein sezerniertes Mitglied der TNF-Rezeptor (TNFR)-Familie mit namensgebenden Wirkungen. Diese Entdeckung wurde durch weitere Gruppen bestätigt und neue Namen, wie TNF receptor-related molecule-1 (TR1; Kwon et al., 1998; Tan et al., 1997) und Follicular dendritic cell receptor-1 (FDCR-1; Yun et al., 1998) wurden vorgeschlagen. Eine revidierte Nomenklatur legte die Bezeichnung OPG für das Protein fest (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature, 2000).

OPG antagonisiert die RANKL-RANK-vermittelten Wirkungen durch kompetitive Bindung sämtlicher RANKL-Formen als dessen löslicher Rezeptorantagonist (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998b; Nakamichi et al., 2007). Die hochaffine Bindung eines OPG-Homodimers an einen RANKL-Homotrimer führt zur Bildung eines stabilen 1:1 Dimer/Trimer-Komplexes. Das OPG-Dimer bindet dabei an zwei RANKL-Moleküle. Die Bindung eines weiteren OPG-Dimers an das dritte RANKL-Molekül ist möglich (2:1 Komplex), allerdings weist diese Bindung eine deutlich geringere Affinität auf. Neben RANKL bindet und neutralisiert OPG einen weiteren TNF-Liganden, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), wobei jedoch die Affinität im Vergleich zu RANKL deutlich geringer ist (Emery et al., 1998).

Die OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion konnte für viele verschiedene normale und maligne Zelltypen (Fiumara et al., 2001; Pettersen et al., 2005) nachgewiesen werden, wobei einige dieser Zellen zusätzlich auch RANKL exprimieren. Im Rahmen des Knochenstoffwechsels wird OPG vor allem von osteoblastäre Zellreihen, Stromazellen und Chondrozyten produziert (Kwon et al., 1998; Horwood et al., 1998; Hofbauer et al., 1998). Im Immunsystem findet sich eine starke OPG-Expression im lymphatischen Gewebe, u.a. in Lymphknoten und

in der Milz, mit einer OPG-Produktion durch dendritische Zellen und B-Lymphozyten (Yun et al., 1998; Schoppet et al., 2007). Eine ausgeprägte OPG-Expression wurde auch im Gewebe des Zahnhalteapparates (Rani et al., 2000; Sakata et al., 1999; Shiba et al., 2000), der Wand großer Arterien (Simonet et al., 1997) und im Schilddrüsengewebe, (Hofbauer et al., 2002b) gefunden. Da die extraskeletale OPG-Expression sehr vielfältig ist, eignet sich die OPG-Serumkonzentration nur bedingt für die Einschätzung des Status der Knochenresorption.

Das humane OPG-Gen liegt auf dem Chromosomen 8q23-24 und umfasst 5 Exons über 29 kb (Hilton et al., 2001). Sowohl das OPG-Gen der Maus (Mizuno et al., 1998a), als auch das des Menschen (Morinaga et al., 1998) wurden kloniert. Die murine OPG-Gen-Expression beginnt zwischen dem 8. und 9. Tag der Embryogenese (Mizuno et al., 1998a). Die humane OPG-mRNA liegt in verschieden langen Formen vor: hauptsächlich in der 2,9 kb langen Form, seltener in einer 4,2 kb oder 6,5 kb langen Form (Morinaga et al., 1998). Der OPG-Gen-Promotor weist Bindungsstellen für Transforming growth factor (TGF)- β (Thirunavukkarasu et al., 2001) und den Osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktor cbfa-1 auf, für den eine OPG-Expression-steigernde Funktion nachgewiesen wurde (Thirunavukkarasu et al., 2000).

OPG ist ein basisches Glykoprotein, das entweder als monomere (55-60 kDa) oder homodimere (110-120 kDa) Form über Verknüpfung mittels einer Disulfidbrücke vorliegt. Die biologischen Aktivitäten beider Formen unterscheiden sich jedoch nicht (Merewether et al., 2000; Tomoyasu et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998). Als Mitglied der TNFR-Superfamilie weist das OPG-Protein Sequenzhomologie zu anderen TNF-Rezeptoren wie TNFR-2 und CD40 auf (Simonet et al., 1997). Bei manchen Zelltypen wurde auch eine zellgebundene Form des OPG gefunden (Yun et al., 1998). Es konnten jedoch noch keine klassischen hydrophoben Transmembranregionen oder für diese kodierende Gensequenzen identifiziert werden. Diese kommen typischerweise bei allen anderen TNFR-Superfamilienmitgliedern vor (Simonet et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998). OPG setzt sich aus 401 Aminosäuren zusammen und hat ein 21 Aminosäuren langes Signalpeptid (Yasuda et al., 1998). Die spezifischen

Funktionen von OPG werden verschiedenen strukturellen Domänen zugeordnet. Die Charakteristika der TNFR, Cystein-reiche Regionen, sind in der N-terminalen Domäne 1 - 4 lokalisiert (Baker und Reddy, 1998) und vermitteln die hemmende Wirkung des OPG auf die Osteoklastogenese durch Bindung von RANKL (Simonet et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998; Yasuda et al., 1998a). Bei anderen TNFR-Mitgliedern, wie TNFR 1, DR 3, CD95/Fas, oder TRAIL nachgewiesene Apoptose-vermittelnde Sequenzen, sogenannte „Death domain homologous“ (DDH)-Regionen, sind in den Domänen 5 und 6 von OPG lokalisiert (Baker et al., 1998; Simonet et al., 1997, Walczak et al., 1997; Chinnaiyan et al., 1996). Tatsächlich konnte die Transduktion apoptotischer Signale durch die OPG-Domänen 5 und 6 gezeigt werden. In diesem Fall wurde Fas mit seiner Transmembranregion zwischen den Domänen 4 und 5 von OPG inseriert und bildete mit OPG ein Fusionsprotein (Yamaguchi et al., 1998). Die für die mögliche Homodimerisierung der OPG-Monomere verantwortlichen Cysteine sind zusammen mit einer Heparin-bindenden Domäne in der C-terminalen Domäne 7 lokalisiert (Merewether et al., 2000; Simonet et al., 1997; Tomoyasu et al., 1998; Yamaguchi et al., 1998). Die Heparin-bindende Domäne findet sich unter anderem auch bei peptidartigen Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen (Zhang et al., 1991) und wird unter anderem als wichtiger Bestandteil der durch OPG geförderten Leukozyten-Endothelzellen-Adhäsion vermutet (Zauli et al., 2007).

1.3. T_H2-Zytokine in der Knochen-Homöostase

Verschiedene Zytokine greifen als humorale Faktoren regulierend in den Knochenstoffwechsel ein. Neben den schon länger bekannten Regulatoren wie Tumor-necrosis factor (TNF)- α und die Interleukine 1 und 6, haben sich auch die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 als wichtige Effektoren im skeletalen System erwiesen.

IL-4 und IL-13 sind 19 kDa und 10 kDa große Proteine mit einer 25%igen Homologie ihrer Aminosäuresequenz und gleichen sich daher größtenteils sowohl in ihren strukturellen, als auch in ihren funktionellen Eigenschaften. IL-4 und IL-13 werden von Antigen-aktivierten T-Lymphozyten (T_H2), sowie von Mastzellen

und Basophilen nach Aktivierung durch Kreuzvernetzung ihrer IgE-Rezeptoren, sezerniert. Hauptsächlich sind sie an der Regulation von Immunfunktionen im Rahmen entzündlicher und allergisch bedingter Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, Asthma bronchiale) beteiligt. Dazu gehören u.a. die Steigerung der MHC-II- und CD23-Expression auf B-Lymphozyten, die Initiierung des Ig-Klassenwechsels von IgG1 und IgE und die Differenzierung der T_H0- zu T_H2-Lymphozyten. Weiterhin haben sie Einfluss auf deren Wachstum, Überleben und Genexpression (Takeda et al., 1997; Chomarat et al., 1998; Nelms et al., 1999; Pernis et al., 2002; Boothby et al., 2001).

Die Modulation des RANKL-RANK-OPG-Systems im Knochen durch humorale Faktoren ist komplex. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 und TNF- α und Kinine des Kallikrein-Kinin-System stimulieren die Osteoklastenaktivität, zum Teil über eine Steigerung der RANKL-Expression (Lerner, 1997; Hofbauer et al., 1999b; Palmqvist et al., 2002). TNF- α und IL-1 sind zudem in der Lage, über RANKL-unabhängige Mechanismen die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten zu fördern (Azuma et al., 2000; Fox et al., 2000; Jimi et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Die stimulierenden Effekte der proinflammatorischen Zytokine können durch IL-4 und IL-13 gehemmt werden (Onoe et al., 1996). Die Expression von OPG wird durch Zytokine wie u.a. TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 mit löslichem IL-6-Rezeptor, IL-11, IL-13, IL-17, IL-18, sowie durch TGF- β , BMP und durch Hormone wie 17 β -Östradiol und Leptin gesteigert. Glukokortikoide, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, Adiponektin, PTH, PGE₂ und basischer FGF unterdrücken die OPG-Expression (Vidal et al., 1998; Hofbauer et al., 1999a; Hofbauer et al., 1999c, Hofbauer et al., 2002a; Onyia et al., 2000; Brandstrom et al., 2001; Nakagawa et al., 1998; Horwood et al., 1998; Chen et al., 2004; Burguera et al., 2001; Schoppet et al., 2002; Collin-Osdoby, 2004; Palmqvist et al., 2006; Luo et al., 2006) (Abb. 5).

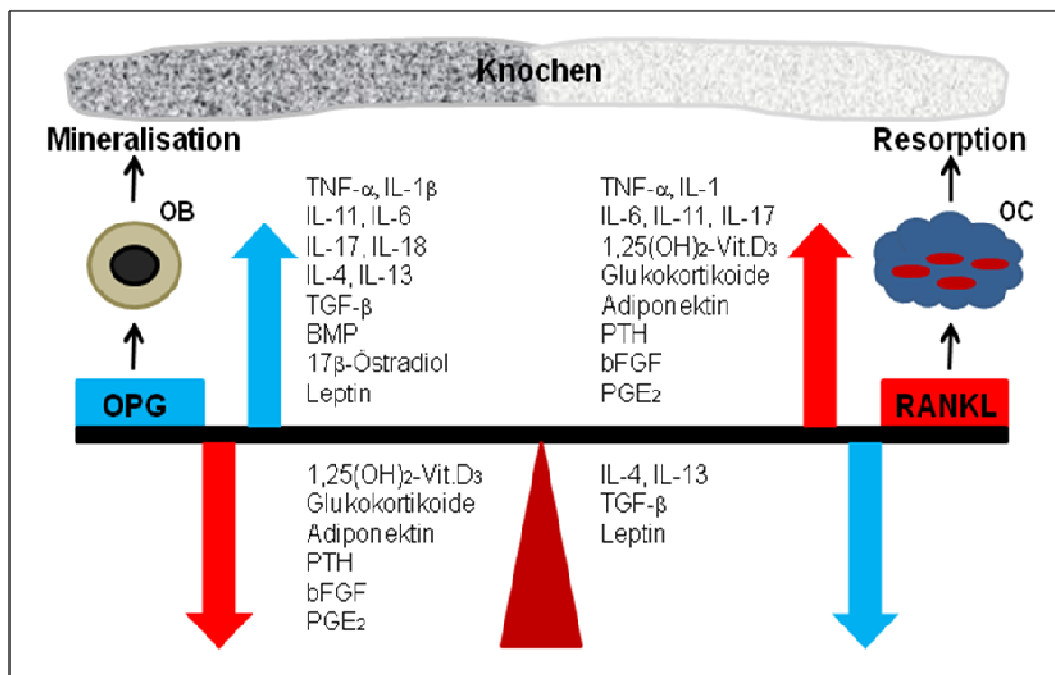


Abb. 5: RANKL/OPG-System im Knochen. Die Knochenhomöostase wird durch das Gleichgewicht von OPG und RANKL gewahrt. Verschiedene Mediatoren tragen zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes bei. Dies resultiert entweder in einer Zunahme der Knochenmasse oder einer verstärkten Resorption. Osteoblasten (OB) und Osteoklasten (OC) sind dabei die hauptsächlichen zellulären Akteure.

1.4. Interaktionen des skeletalen und des vaskulären Systems

1.4.1. Osteoklasten und Endothelzellen

Im Gegensatz zu Osteoblasten, die von mesenchymalen, nicht-hämatopoietischen pluripotenten Stammzellen abstammen (Ducy et al., 2000), leiten sich Osteoklasten von monozytär-makrophagozytären Vorläuferstufen ab (Teitelbaum, 2000; Seta et al., 2008). Die Entwicklung zum resorbierenden Osteoklasten umfasst dabei die Fusion zu multinukleären Zellen, einem komplexen Differenzierungsprozess und die durch den Kontakt zu Knochengewebe induzierte Polarisierung mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts. Stromazellen des Knochenmarks oder osteoblastäre Zellen sind notwendig für die Expression des für die Osteoklastogenese essentiellen RANKL und des Macrophage colony

stimulating factor (M-CSF). Mäuse, die eines der beiden Proteine nicht exprimieren, sind zur Ausbildung von aktionsfähigen Osteoklasten nicht fähig und entwickeln einen osteopetrotischen Phänotyp (Teitelbaum, 2000). M-CSF induziert durch Bindung seines Rezeptors c-fms auf mononukleären phagozytierenden Zellen, den frühen Vorläufern der Osteoklasten, deren Überleben und Proliferation und hat somit essentielle Bedeutung für die Osteoklastogenese (Doherty et al., 2004; Teitelbaum, 2006). Der von Stromazellen des Knochenmarks und osteoblastären Zellen exprimierte Ligand RANKL interagiert mit seinem spezifischen Rezeptor RANK auf den osteoklastären Vorläuferzellen und induziert dadurch deren Überleben, Fusion und Ausdifferenzierung zu reifen funktionsfähigen Osteoklasten. T-Lymphozyten exprimieren ebenfalls RANKL und können so die Osteoklastogenese fördern, was insbesondere bei inflammatorischen Knochenerkrankungen eine Rolle spielt (Lacey et al., 1998; Kong et al., 1999).

Endothelzellen finden sich in jedem Organsystem und regulieren die Verteilung der über das Blut transportierten Nährstoffe, biologisch aktiven Moleküle und zellulären Bestandteilen. Das Endothel bildet eine selektive Barriere, die mittels Rezeptoren und bestimmter Bindungsproteine den Durchtritt für verschiedene Moleküle wie u.a Proteine (Wachstumsfaktoren, Gerinnungsfaktoren und deren Inhibitoren), Lipoproteine, Metabolite (NO, Serotonin, Endothelin-1) und Hormone ermöglicht. Das Endothel reguliert den Muskeltonus der Gefäßwand, den Blutfluss durch Veränderung seiner Oberfläche und die Permeabilität für Zellen in die Gefäßwand. Diese Funktionen sind durch humorale Faktoren zu beeinflussen und verändern sich z.B. bei Entzündungsvorgängen. Hierbei kann es statt zur physiologischen Vasodilatation zur Vasokonstriktion (z.B. durch PAF, ET-1) und zur Ausbildung einer antifibrinolytischen und thrombogenen Oberfläche kommen. Auch eine Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, P-Selektin, VCAM, ICAM, PECAM) kann so induziert werden und den Durchtritt u.a. für Leukozyten und Makrophagen in die Gefäßwand bzw. die Anhaftung von Thrombozyten an die Endotheloberfläche ermöglichen. Weiterhin sind Endothelzellen zur Neoangiogenese unter Induktion durch spezifische Proliferationsfaktoren und interzelluläre Kontakte fähig, was

nicht nur in der Embryogenese, sondern auch bei der Wundheilung, im Rahmen von Entzündungen oder bei der Progredienz von Tumoren eine Rolle spielt.

Die Angiogenese spielt eine wichtige Rolle in der enchondralen Knochenbildung (Parfitt, 2000). In der Zone der provisorischen Kalzifizierung wird die kalzifizierte Knorpelmatrix durch Osteoklasten resorbiert. Unterstützt durch die Osteoklasten und stimuliert durch von hypertrophen Chondrozyten sezernierten VEGF penetrieren Blutgefäße den werdenden Knochen und transportieren die Bestandteile des zukünftigen, hämatopoietischen Knochenmarks (Gerber et al., 1999, Tanaka et al., 2007). Vaskuläre Endothelzellen befinden sich in direkter Nachbarschaft zu den knochenresorbierenden Osteoklasten, während die knochenbildenden Osteoblasten sich hinter der Resorptionsfront befinden. Die Vaskularisierung des Knochens ist somit eng mit der Skelettbildung assoziiert und die Barriere-bildende Endothelzellschicht zwischen Blut und Stroma ist möglicherweise entscheidend an der Bereitstellung verschiedener Zytokine und Zellen für die Knochenresorption und Knochenbildung aus dem peripheren Blut beteiligt. Eine Interaktion von skeletalem und vaskulärem System spiegelt sich auch in der Expression von Endothel-wirksamen Faktoren wie VEGF und Osteopontin durch Osteoblasten, hypertrophe Chondrozyten, Osteoklasten und Zellen des multiplen Myeloms (Harada et al., 1994, Tanaka et al., 2007) sowie der endothelialen Expression von Osteoklasten-beeinflussenden Faktoren wie Endothelin-1, NO und Activation inducible TNF related ligand (AITRL, synonym TNF ligand superfamily member 18, TNFSF18) wieder (Alam et al., 1992; MacIntyre et al., 1991, Nardelli et al., 2006).

Eine veränderte endotheliale Funktion bei entzündlichen Erkrankungen kann möglicherweise eine Beeinflussung anderer Zellen durch ein verändertes Expressionsprofil nach sich ziehen. So könnte auch eine veränderte Interaktion zwischen Endothelzellen und Osteoklasten unter inflammatorischen Bedingungen eine Rolle bei verschiedenen systemischen Erkrankungen mit verändertem Knochenstoffwechsels spielen.

1.4.2. Kalzifizierungsprozesse im Gefäßsystem

Die Kalzifizierung oder Biomineralisierung extrazellulärer Matrix im skeletalen Knochen, Zähnen oder Knorpelgewebe der Wachstumsfugen ist ein physiologischer Prozess. In physiologisch nicht kalzifizierenden Geweben wird dieser Vorgang als heterotope Kalzifizierung bezeichnet (Collin-Osdoby, 2004; Johnson et al., 2006).

Interaktionen zwischen Knochenstoffwechsel und dem vaskulären System wurden vielfach in Modellen der vaskulären Kalzifizierung und in Studien zu Atherosklerose und Osteoporose beobachtet und untersucht. Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten als Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei älteren Menschen und postmenopausalen Frauen (Baldini et al., 2005). Verschiedene Studien belegen eine Assoziation von atherosklerotischer Gefäßkalzifizierung mit osteoporotischen Frakturen und Übereinstimmungen bei den Risikofaktoren beider Erkrankungen. Es werden ein zugrundeliegender gemeinsamer Pathomechanismus und eine genetische Prädisposition vermutet (Yamaguchi et al., 2006; Yamaguchi et al., 2002; Kemink et al., 2000; Cappuccio et al., 1999). Möglicherweise besteht ein gemeinsamer Regulationsmechanismus der Mineralisierungs- und Demineralisierungsprozesse im Skelettsystem und im kardiovaskulären System.

Im Gefäßsystem werden die intimale Kalzifizierung bei der Atherosklerose und die Mönckeberg'sche Mediasklerose unterschieden. Die arterielle Kalzifizierung der medialen Gefäßwandschicht wird als von der Atherosklerose unabhängige Komponente vaskulärer Kalzifizierung gesehen, auch wenn aufgrund der Multimorbidität bei älteren Patienten oftmals beide Formen anzutreffen sind (Abedin et al., 2004a). Beide Typen der arteriellen Kalzifizierung sind mit einer signifikanten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert (Lehto et al., 1996).

Die Atherosklerose ist durch einen chronischen Entzündungsprozess der arteriellen Gefäßwand gekennzeichnet. Die Progredienz erfolgt entweder langsam und lange klinisch inapparent bis es mit zunehmender Okklusion der Arterien zu einer Organminderversorgung kommt, oder aber rasch progredient mit frühen

ischämischen Ereignissen. Die häufigste klinische Manifestation der Atherosklerose ist die koronare Herzkrankheit mit pektanginösen Beschwerden. Komplizierend kann hier die Plaqueruptur mit Okklusion der Koronararterien zum Herzinfarkt führen. Trotz sehr hoher Prävalenz der Atherosklerose in höherem Alter (Strong, 1986) ist eine klinische Manifestation nicht obligat (Lloyd-Jones et al., 1999). Atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand sind nicht nur bei älteren, sondern auch bereits bei jungen Menschen in frühen, klinisch inapparenten Entwicklungsstadien nachzuweisen (Ross, 1999; Lloyd-Jones et al., 1999; Napoli et al., 1997).

Im Rahmen der Atherogenese kommt es initial zur Aktivierung bzw. Schädigung des Endothels durch freie Radikale, endogene und exogene Entzündungsmediatoren, inflammatorische Prozesse mit lokaler Entzündungsreaktion der Gefäßwand, Lipidablagerungen und thrombotische Prozesse sowie im Verlauf zu Kalzifizierungen der Gefäßwand (Ross, 1999, Libby 2001, Ehara et al., 2004, Abedin et al., 2004a, Fujii et al., 2005, Virmani et al., 2006, Chang et al., 2007). Bei der intimalen Kalzifizierung im Rahmen der Atherosklerose kann es zu einer heterotopen Ossifikation kommen, die der enchondralen Ossifikation ähnelt (Vattikuti und Towler, 2004).

Unabhängig von einer Atherombildung kann es auch zu einer Kalzifizierung der medialen Arterienwand kommen. Diese wurde erstmals als Mönckeberg'sche Sklerose beschrieben (Mönckeberg, 1903). Die mediale Arterienkalzifizierung wird häufig und in ausgeprägter Form im Zusammenhang mit generalisierten metabolischen Störungen, wie Störungen des Elektrolyt- und Säure-Base-Haushaltes, bei Hyperphosphatämie (Block et al., 1998), Hypomagnesiämie (Wei et al., 2006), chronischer Niereninsuffizienz (Kettler et al., 2005) und Diabetes mellitus (Letho et al., 1996) angetroffen. Allerdings kann sie auch bei jungen Patienten auftreten, die keine metabolischen Störungen aufweisen (Top et al., 2002). Die Kalzifizierung der Media nimmt linear mit dem Alter zu und ist bei älteren Menschen fast immer nachzuweisen (Elliott und McGrath, 1994). Im Gegensatz zur intimalen Kalzifizierung ähnelt die mediale Kalzifizierung einer nicht-enchondralen, intramembranösen Knochenbildung (Vattikuti und Towler, 2004), die auf einer Osteoblasten-induzierten Kalzifizierung kollagener

extrazellulärer Matrix basiert (Karsenty, 2003). Die Läsionen der arteriellen Gefäßwand ähneln dabei orthotopem Knochengewebe (Tomazic, 2001; Guo et al., 2000; Bostrom et al., 1993). Sowohl bei der intimalen, als auch bei der medialen Kalzifizierung findet sich eine zelluläre Transdifferenzierung mit Ausbildung von Zellen die phänotypisch an Knochenmarkzellen, Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten und Osteoklasten erinnern, sowie eine Expression knochen-ähnlicher Matrixproteine, die in normalen Arterien nicht zu finden sind (Doherty et al., 2004; Moe et al., 2002; Shanahan et al., 1999).

Anfangs wurde die vaskuläre Kalzifizierung als ein rein passiver Prozess basierend auf einem Transfer von Kalzium aus dem Skelettknochen in die Gefäßwand oder der Ablagerung überschüssiger, im Gefäßsystem zirkulierender Minerale beschrieben (Schinke et al., 1999). Zunehmend wird zusätzlich ein aktiv regulierter Prozess als Ursache von vaskulären Kalzifizierungsprozessen angenommen (Mody et al., 2003; Johnson et al., 2006). Es wird vermutet, dass der vaskulären Kalzifizierung und Ossifikation regulierte Prozesse zugrunde liegen, die von spezifischen Faktoren in der Gefäßwand positiv wie auch negativ reguliert werden (Doherty et al., 2004; Bostrom und Demer, 2000). Ein Überwiegen der pro-kalzifizierenden und pro-osteogenen Faktoren bzw. ein kausaler oder sekundärer Mangel an Inhibitoren würde somit die Kalzifizierung der Gefäßwand und die Ausbildung extraskeletalen Knochengewebes fördern.

Die Dysregulation des RANKL/RANK/OPG-Systems spielt eine Rolle in der Pathophysiologie von Knochenumbauvorgängen im Rahmen verschiedener Erkrankungen, wie z.B. bei der postmenopausalen und Glukokortikoid-induzierten Osteoporose, rheumatoider Arthritis und auch bei malignen Erkrankungen, wie dem multiplen Myelom (Vega et al., 2007). Sowohl Veränderungen der Hormonkonzentration im Körper wie z.B. die Konzentration der Sexual- und Steroidhormone bei postmenopausaler oder Glukokortikoid-induzierten Osteoporose, als auch Milieu-Veränderungen im Sinne chronischer Entzündungen wie bei der rheumatoiden Arthritis oder der Atherosklerose ziehen dabei eine Veränderung des RANKL/OPG-Gleichgewichtes und in Folge Umbauvorgänge im Knochen nach sich. Das RANKL/RANK/OPG-System stellt möglicherweise das zentrale Bindeglied zwischen skeletalen und vaskulären

pathophysiologischen Veränderungen dar, zumal OPG als löslicher Inhibitor von RANKL nicht nur von Zellen des Knochenstoffwechsels, sondern auch u.a. von vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen produziert und sezerniert wird (Bucay et al., 1998; Min et al., 2000; Chikatsu et al., 2002; Hofbauer et al., 2006).

Ein Großteil OPG-defizienter Mäuse entwickelten neben einem osteoporotischen Knochenphänotyp auch mediale Kalzifizierungen der Aorta und Nierenarterien (Bucay et al., 1998; Mizuno et al., 1998b), deren Ausbildung durch transgene OPG-Überexpression von Mitte der Schwangerschaft an verhindert werden konnte (Min et al., 2000). Weiterhin konnte eine simultane subkutane Behandlung mit OPG die durch Warfarin oder Vitamin D induzierten arteriellen Kalzifizierungen bei Ratten verhindern (Price et al., 2001). Hinweise auf eine protektive Funktion von OPG auch bei der Atherosklerose lieferten OPG^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäuse, bei denen sich mit zunehmendem Alter die Plaquefläche vergrößerte, die Zelldichte der Gefäßwand abnahm und der Kollagen- und Proteoglykangehalt sowie die Kalzifizierung der intimalen Läsionen zunahm. Zusätzlich zeigte sich bei diesen doppeldefizienten Mäusen eine ausgeprägte mediale Kalzifizierung (Bennett et al., 2006). In LDL-Rezeptor^(-/-)-Mäusen, die unter atherogener Diät kalzifizierende Atherosklerose-Plaques entwickelten, konnte das Ausmaß der Kalzifizierung durch Behandlung mit rekombinantem OPG signifikant reduziert werden (Morony et al., 2008). Nicht nur im Tiermodell, sondern auch bei Menschen gibt es Hinweise für eine Verbindung zwischen Osteoporose und vaskulärer Kalzifizierung: Sie zeigen insbesondere bei postmenopausalen Frauen und älteren Menschen auf eine hohe Koinzidenz (Hofbauer und Schoppet, 2001). Die Plasmakonzentration von OPG war mit dem Kalzium-Gehalt in Koronararterien assoziiert (Abedin et al., 2007). Eine erhöhte Serumkonzentration an OPG wurde zudem bei Patienten mit KHK (Jono et al., 2002; Schoppet et al., 2003) und Atherosklerose der Carotiden (Kiechl et al., 2004, Kadoglou et al., 2008) beobachtet und zeigte eine Assoziation mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität (Browner et al., 2001; Kiechl et al., 2004). Weiterhin konnte eine Verbindung zwischen Polymorphismen des OPG-Gens mit der vaskulären Morphologie und Funktion (Brandstrom et al., 2002) sowie mit einem gesteigerten Risiko für eine KHK (950TC/1181GC und 950CC/1181CC, Soufi

et al., 2004) festgestellt werden. Die Assoziation von OPG-Serum-Konzentrationen mit vaskulären Erkrankungen konnte inzwischen von verschiedenen Gruppen in einer Vielzahl verschiedener Gefäßgebiete und unter verschiedenen Evaluationsbedingungen bestätigt werden (Kiechl et al., 2006).

2. Fragestellung

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die Regulation der OPG-Expression in humanen Endothelzellen zu charakterisieren und Erkenntnisse über deren Bedeutung in der Regulation des Knochen- und Gefäßstoffwechsels zu gewinnen.

Die zentrale **Hypothese** ist, dass die OPG-Produktion in humanen Endothelzellen durch die T_H2 -Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 in STAT6-abhängiger Weise reguliert wird und dass diese OPG-Produktion einen parakrinen Effekt auf Osteoklasten hat.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden verschiedene Einzelprojekte *in vitro* durchgeführt:

- **STAT6-abhängige Regulation der Osteoprotegerin-Produktion durch die T_H2 -Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 in humanen Endothelzellen**
- **IL-4-Rezeptor-spezifische Signaltransduktion der IL-4-induzierten STAT6-Aktivierung und OPG-Expressionssteigerung**
- **Hemmung der Signaltransduktion durch spezifische Phospholipase C-Blockade**
- **Direkte Wirkung der T_H2 -Zytokine auf die Osteoklastogenese**
- **Parakrine Modulation der Osteoklastogenese durch Endothelzellen**

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellen

Endothelzellen

Die humanen Zellen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) wurden als primäre Endothelzellen aus Nabelschnurvenen gewonnen, deren Verwendung nach Aufklärung durch eine schriftliche Einwilligung der Eltern des Neugeborenen gestattet wurde (Patientenaufklärung und Einverständniserklärung siehe Anhang). Die Entbindungen fanden im Diakonie-Krankenhaus Wehrda und im Universitäts-Klinikum in Marburg statt. Die Versuche, in denen diese Zellen verwendet wurden, sind von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg genehmigt worden (Aktenzeichen 78/05).

Osteoklasten

Es wurde das Poietics osteoclast precursor system der Firma Cambrex (Verviers, Belgien) verwendet, welches primäre humane Osteoklasten-Vorläuferzellen (OCP) beinhaltet. Diese Zellen zeigten in entsprechender Kultur nach 7-11 Tagen Osteoklasten-Morphologie und eine aktive Resorption von Kollagenmatrix.

3.1.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Zellisolierung

Sterile Abdecktücher als Arbeitsunterlage sowie die sterilen Tupfer wurden von der Paul-Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland) bezogen. 10 ml Spritzen und 0,9 x 25 mm Braunülen lieferte die B. Braun-Melsungen AG (Melsungen, Deutschland). Als Desinfektionsmittel wurden Gigasept FF und Terralin Liquid der Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland) verwendet. Einmal-Latex-Handschuhe lieferte die NOBA-Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG (Wetter,

Deutschland). Die Kollagenase A zur HUVEC-Isolierung kam von Roche (Grenzach, Deutschland).

Zellkultur

Die in der Zellkultur verwendeten Zellkulturflaschen (75 cm² oder 25 cm²), 6 Well-Zellkulturplatten, Cryo-Gefäße, Zentrifugenröhrchen, Glaspipetten und Einmalzellschaber wurden von Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland) bezogen, die Petrischalen von Becton Dickinson (Plymouth, UK). Medium 199, Trypsin-EDTA-Lösung für Endothelzellkulturen, Typ 1 Rattenschwanz-Kollagen, ECGF stammte von Sigma (Steinheim, Deutschland). L-Glutamin lieferte Biochrom AG (Berlin, Deutschland). Penicillin (10.000 Units/ml)/Streptomycin (10 mg/ml), fetales Kälberserum (FCS) und Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS) (mit Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) waren von PAA Laboratories (Pasching, Austria). D-PBS (ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) stammte von Gibco BRL (Paisley, UK). Alle Materialien zur Kultur der Osteoklasten inklusive OsteoLyseAssay Kit und OCP BulletKit, OCP Basal Medium und OCP Growth Medium SingleQuot Kit wurden von Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien) bezogen.

Die Zytokine IL-4, IL-13, sowie der lösliche IL-4 –Rezeptor und der OPG-Antikörper waren von R & D (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland). Der Inhibitor D-609 stammte von Biomol (Hamburg, Deutschland), G-418 von PAA Laboratories (Pasching, Austria). Als Lösungs- und Verdünnungsmittel der Stimulanzen dienten Ethanol absolut von der Firma Riedel-de-Haen (Seelze, Deutschland), bovines Serum-Albumin (BSA) und DMSO von Sigma.

RNA-Isolierung

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy-Mini-Kit und der QIAshredder der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. β -Merkaptoethanol war von Sigma.

Northern Blot

Für das Agarose-Gel und den Auftragspuffer im Rahmen der Gelelektrophorese wurden Agarose von Gibco BRL (Paisley, UK), Formamid und Formaldehyd-Lösung von Sigma eingesetzt. Des Weiteren wurden Chromatographiepapier von

Whatman (Maidstone, UK), Nylonmembranen von Amersham (Little Chalfont, UK) und Saugpapier von Kimberly-Clark (Reigate, UK) verwendet. Methylenblau, MOPS, Bromphenolblau, Xylenzanol, NaCl, Natrium-Zitrat und Glycerol, Natrium-Azetat, Eisessig 99,8%, Natriumhydroxid und EDTA wurden von Sigma bezogen.

Radioaktive Markierung von cDNA und Northern Blot-Hybridisierung

Das Wizard-DNA-purification-Kit war von Promega (Madison, USA) und das Restriktionsenzym *EcoRI* war von Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland). Zur radioaktiven Markierung wurde das DECAprime-II-DNA-Labeling-Kit von Ambion (Austin, TX, USA) verwendet. Amersham lieferte die [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP-Nukleotide, sowie Senzacon zur Reinigung der verwendeten Geräte. Strahlenschutzvorrichtung und die Reinigungssäulen für radioaktive Sonden wurden von Stratagene (La Jolla, CA, USA) bezogen. Die Express-Hybridisierungslösung stammte von Clontech (Palo Alto, CA, USA), die humane β -Aktin-cDNA von BD Biosciences (Erembodegem, Belgien). Die Hybridisierungsbeutel waren von Gibco BRL (Paisley, UK). Die Kassetten mit Verstärkerfilmen in der Größe 20 cm \times 25 cm wurden von Rego (Augsburg, Deutschland) bezogen. Die passenden Röntgenfilme lieferte Kodak (Rochester, NY, USA).

Western Blot

Die Bradford-Lösung zur Proteinkonzentrationsbestimmung, der Marker SDS-PAGE Standard Broad Range und die Nitrozellulose-Membranen wurden von Bio Rad (Hercules, CA, USA) und der Röntgenfilm (Hyperfilm) von Amersham /GE Healthcare (München, Deutschland) bezogen. Sigma lieferte TEMED, Tween 20, Tris Base, Tris und Ammoniumperoxiddisulfat. Milchpulver und Rotiphoresen kamen von Roth (Karlsruhe, Deutschland), die Substanzen KCl, Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 und HCl von Merck (Darmstadt, Deutschland), Glyzin von Riedel-de-Häen und Towbin-Puffer und DTT (Dithiothreitol) von der Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland). Die verwendeten Antikörper gegen STAT6 und Phospho-STAT6 (Tyr641) und der horseradish peroxidase (HRP)-konjugierten anti-rabbit-IgG-Antikörper wurden von Cell Signaling Technology

(Frankfurt, Deutschland) bezogen, das zur Detektion verwendete SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate von Pierce Biotechnology (Rockford, Irland).

OPG-Protein-Quantifizierung

Zur Quantifizierung wurde das Osteoprotegerin ELISA Kit von Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland) verwendet. Die Präzision und Reproduzierbarkeit dieses ELISAs beträgt 6 - 8 % (Intra-Assay Varianzkoeffizient) und 3 - 5 % (Inter-Assay Varianzkoeffizient). Die untere Nachweisgrenze für OPG liegt bei 0,14 pmol/l.

Osteoklasten-Assay

Der verwendete Osteoklasten-Assay Kit wurde von der Firma Cambrex bezogen.

3.1.3. Lösungen und Puffer

BSA in PBS

1 × PBS (Phosphate buffered saline); 0,1% BSA (Bovine serum albumin)

DEPC-behandeltes Wasser

destilliertes Wasser mit 0,1% DEPC; nach 24 h 30 min autoklavieren

Northern Blot

Farbstoffpuffer für RNA-Gele

50 % Glyzerol; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol;

1 mM EDTA pH 8,0

Methylenblau-Lösung

0,04 % Methylenblau; 0,8 M Natriumazetat pH 4,0

10 × MOPS

20 mM MOPS (3-(N-morpholino) Propansulfonsäure); 5 mM Natriumazetat;
0,1 mM EDTA; mit NaOH pH-Wert 7,0 einstellen.

20 × SSC (Standard sodium citrate)

3 M Natriumchlorid; 0,3 M Natriumzitat pH 7,0

Hybridisierung

Waschlösung 1

2 × SSC; 0,05 % SDS (Sodium dodecylsulphate)

Waschlösung 2

0,1 × SSC; 0,1 % SDS (Sodium dodecylsulphate)

Western-Blot

10x PBS-Puffer

80 g/l NaCl (136 mM); 2 g/l KCl (2,7 mM); 11,5 g/l Na₂HPO₄ (12,1 mM); 2 g/l K₂HPO₄ (1,5 mM); mit 1 M HCl pH-Wert 7,4 einstellen

Lysepuffer

62 mM Tris/HCl (pH 6,8); 2 % v/w SDS; 10 % Glycerol; 50 mM DTT; 0,01 % Bromphenolblau

5 x Laemmli-Probenpuffer

310 mM Tris/HCl (pH 6,8); 50 % Glycerol (w/v); 10 % SDS; 0,5 % Bromphenolblau; Vor Verwendung β-Merkaptoethanol zusetzen (Endkonzentration 3,5 % (v/v)) und gut mischen.

Trenngel-Puffer

0,08 g Tris Base (1,5 M); 20 % SDS; auf 500 ml aqua dest; pH = 8,8

Trenngel-Lösung (12 %)

40 ml Trenngelpuffer; 36 ml Glyzerol; 20 ml aqua dest; 64 ml Rotiphorese (Acrylamid)

Sammelgel-Puffer

30 g Tris Base (0,5 M); 20 % SDS; auf 500 ml aqua dest; pH = 6,8

Sammelgel-Lösung (12 %)

50 ml Sammelgelpuffer; 118 ml aqua dest; 32 ml Rotiphorese

10 x Laufpuffer

20 g SDS; 288 g Glyzin; 60,6 g Tris; auf 2 l aqua dest; für Gelelektrophorese auf 1:10 verdünnen mit aqua dest

Transfer-Puffer

100 ml Towbin-Puffer; 900 ml aqua dest; 200 µl Tween 20

10 x Tris Buffered Saline (TBS)

auf 1 l Aqua dest: 24,2 g Tris; 80 g NaCl; mit HCl pH 7,6 einstellen

Blockierungspuffer (Milch-TBS/T)

40 ml 1 x TBS; 0,1 % Tween-20; 2 g Milchpulver (5 % w/v)

Wasch-Puffer (TBS/T)

1 x TBS; 0,1 % Tween-20

Antikörper Lösungspuffer (BSA-TBS/T)

1 x TBS; 0,1 % Tween-20; 5 % BSA

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und andere physikalische Angaben wurden die internationalen SI- Einheiten oder deutsche gesetzliche Einheiten verwendet.

3.1.4. Geräte

In der Zellkultur wurde ein Sterilflow Modell Lamin Air HB 2448 von Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland) verwendet. Ebenfalls von Heraeus Instruments waren ein CO₂-begaster Brutschrank und eine Zentrifuge. Das Wachstum der Zellen wurde mit einem Mikroskop von Olympus Corporation (Tokyo, Japan) beurteilt. Die RNA-Isolierung wurde in einer Zentrifuge von Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg, Deutschland) durchgeführt und die Quantifizierung der RNA erfolgte in einem Spektralphotometer Gene Quant von Pharmacia (Cambridge, UK). Zum Trocknen der RNA-Proben im Rahmen des Northern Blot wurde eine Kühlfalle Alpha I-5 von Christ (Osterode, Deutschland) mit angeschlossener Zentrifuge von Bachofer (Reutlingen, Deutschland) und Vakuumpumpe von Pfeiffer (Asslar, Deutschland) eingesetzt. Zum Erhitzen der Proben zwecks Denaturierung wurde ein Thermomixer von KOBE (Wetter, Deutschland) eingesetzt. Die horizontale Gelelektrophorese lief in einer Kammer mit passendem Netzgerät Power Pac 200 von Bio Rad Laboratories (Richmond, USA). Die RNA wurde mit Hilfe des UV Stratalinker™ 2400 von Stratagene (La Jolla, CA, USA) auf der Nylonmembran fixiert. Bei der Hybridisierung wurde ein Hybridisierungssofen von Bachofer verwendet. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einem Filmautomat Curix 60 von Agfa (Köln, Deutschland). Die Zelllysate-Proben wurden im Rahmen des Western Blot mit einem Ultraschallgerät von B. Braun-Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) sonifiziert und in einem Thermoblock DriBlock DB 2A von Techne AG (Burkhardtshausen, Deutschland) gekocht. Zur Gelelektrophorese wurde das Thermo EC-Mini Vertical Gel System von Techtum (Umea, Schweden) mit passendem Netzgerät Power 300 von Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, Frankreich) verwendet, der Blot erfolgte in Blotkammern von Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) mit einem Netzgerät von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, CA, USA). Die zur Proteinmessung eingesetzten Mikrotiterplatten wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer MRX von Dynatech Laboratories (Guernsey,

UK) gelesen. Es wurden Pipetten von Eppendorf (Hamburg, Deutschland; Multipipette plus) und von Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland; Pipetus-Akku) verwendet. Die Tischzentrifuge war von Stratagene (La Jolla, CA, USA) und der Autoklav war von Fritz Gössner (Hamburg, Deutschland). Zur Fluoreszenz-Messung wurde das Fluoreszenz-Fluorimeter BMG FluoStar Galaxy von BMG Labtechnologies (Offenburg, Deutschland) verwendet, die Software kam von der ReTiSoft Inc. (Toronto, Kanada).

3.2. Methoden

3.2.1. Endothelzellgewinnung aus humanen Umbilikalvenen

Nabelschnur

Zur Gewinnung der Endothelzellen wurden nur Nabelschnüre verwendet, bei denen die Abtrennung von Plazenta und Neugeborenem maximal 24 h zurücklag und diese dabei doppelseitig abgeklemmt worden waren. Unmittelbar nach der Abtrennung wurde die Nabelschnur in einen Sterilbehälter, gefüllt mit Dulbecco's PBS-Puffer gegeben. Darin erfolgte auch der Transport zum Arbeitsplatz, so wie ggf. die Aufbewahrung bei 4 °C bei längerem Zeitintervall bis zur Aufarbeitung. In optimaler Weise erfolgte die Aufarbeitung der Nabelschnur direkt nach der Entbindung. Um eine für eine Kultivierung ausreichende Anzahl an HUVEC aus einer Nabelschnur zu gewinnen, wurde auf eine Mindestlänge von 10 cm bei der Abklemmung geachtet.

Isolierung von Endothelzellen

Die Zellisolierung erfolgte unter einem Sterilflow bei Raumtemperatur, das verwendete chirurgische Besteck wurde nach jeder Verwendung gewaschen, desinfiziert, autoklaviert und steril verpackt gelagert. Als Arbeitsunterlage dienten sterile Tücher, des Weiteren wurden einmal-verwendbare Handschuhe und Gebrauchsmaterialien benutzt.

Um das Risiko der Übertragung von Bakterien von der Außenseite der Nabelschnur in das Lumen der Vene zu reduzieren, wurde diese gründlich mit 70 % Ethanol gesäubert. Die Nabelschnur wurde knapp oberhalb der unteren Klemme abgeschnitten, um das noch in der Umbilikalvene befindliche Blut zu entfernen. Die Schnittfläche wurde mit Steriltupfern abgetupft. Eine Braunüle, deren Nadel entfernt, Schlauch gekürzt, sowie Seitenflügel abgeschnitten waren, wurde vorsichtig eingeführt und mittels chirurgischer Klemme in ihrer Lage lumenabschließend fixiert. Die Überprüfung der Dichtigkeit des Abschlusses und der korrekten Lage der Braunüle erfolgte durch Anspülen mit Dulbecco's PBS.

Anschließend wurde die zweite Klemme ebenfalls abgeschnitten und die Umbilikalvene mit Dulbecco's PBS mehrfach gespült, bis das Effluat klar war.

Zur Lösung der HUVEC von der extrazellulären Matrix wurde 0,2 %ige Kollagenase A verwendet. Die in Pulverform gelieferte Kollagenase A wurde dazu in 50 ml Dulbecco's PBS gelöst und steril gefiltert. Je nach Länge der Nabelschnur wurden 5 - 7 ml Kollagenase-Lösung mit Hilfe einer 10 ml-Spritze über die Braunüle in die nun mit einer zweiten chirurgischen Klemme am anderen Ende verschlossene Vene gefüllt und die Spritze als Stopfen auf der Braunüle belassen. Ummantelt mit Alufolie folgte eine Inkubation für 15 min über einem Wasserbad (37 °C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die untere Klemme wieder entfernt und das Effluat in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Nachspülung der Vene erfolgte mit 20 ml Dulbecco's PBS und unterstützender Massage der Nabelschnur. Das Effluat wurde für 5 min bei 200 x g, 20 °C, zentrifugiert, der Überstand anschließend abgegossen, das Zellpellet mit 13 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt. Eine mikroskopische Kontrolle zeigte HUVEC-Zellcluster und Erythrozyten.

Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um die Erythrozyten und nicht angewachsene HUVEC zu entfernen. Die HUVEC hatten zu diesem Zeitpunkt clusterförmige Monolayer ausgebildet.

3.2.2. Zellkultur der HUVEC

Um eine optimale Zelladhäsion und stabile Haftung der HUVEC in Kulturflaschen, Petrischalen und 6-Well-Kulturplatten zu erreichen, wurden diese mit Kollagen Typ 1 der Ratte beschichtet.

Dazu wurden 25 mg Rattenschwanz-Kollagen in 250 ml 0,1 M Essigsäure gelöst. In 75 cm²-Kulturflaschen wurden 6 ml gegeben, in 4 ml-Petrischalen 2 ml und 1 ml je Well einer 6-Well-Kulturplatte. Diese wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Kollagen-Lösung abgesaugt und die Kulturflaschen und Petrischalen über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂)

inkubiert. Anschließend wurden diese wieder bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und vor Verwendung mit Dulbecco's PBS gespült.

Das Kulturmedium setzte sich zusammen aus basalem Medium (Medium 199, Sigma) mit 1 % L-Glutamine und 0,4 % Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml), 20 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % ECGF. Das FCS wurde für 30 min im Wasserbad bei 56 °C erhitzt, um die Komplementfaktoren zu inaktivieren.

Die Inkubationsbedingungen des Brutschrankes wurden auf eine Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Anteil von 5 % adjustiert.

Alle 48-72 h erfolgte ein Mediumwechsel. Bei einem subkonfluenten Bewuchs der Kulturflasche von 80-90 %, bzw. bei vollständiger Konfluenz der Zellcluster mit einer Abkuglung der spindelförmigen HUVEC, erfolgte eine Teilung der Kultur. Abhängig von der bei der Isolierung gewonnenen Anzahl an HUVEC war eine erste Passagierung nach durchschnittlich einer Woche Kultur möglich. Für die Experimente wurden Zellen maximal nur bis zur zweiten Passage verwendet.

Zellteilung

Zur Passagierung wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Kultur mit D-PBS (ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) zweimal gespült. Anschließend wurden 1,5 ml Endothel-Trypsin-EDTA zugesetzt und 3 - 4 min im Brutschrank inkubiert, um die Adhärenz des HUVEC-Monolayers am Kulturflaschenboden aufzuheben. Um den Ablösevorgang zu unterstützen, wurde leicht von unten gegen die Kulturflasche geklopft.

Zugabe von 10 - 15 ml Kulturmedium (ohne endothelialen Wachstumsfaktor; ECGF) stoppte die Reaktion. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde entsorgt und das Zellpellet mit 4 ml Kulturmedium (ohne ECGF) resuspendiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet mit 4 ml Kulturmedium (ohne ECGF) resuspendiert. Es folgte die

Entnahme von 10 µl dieser Suspension zur Zellzählung mit der (Neubauer)-Zählkammer (gezählte Zellen x 10.000 = Gesamtzellzahl in der Suspension).

Bei Neuaussaat der Zellen wurden in eine Kulturflasche 5×10^5 - 10^6 Zellen, in 4 ml-Petrischalen 15×10^4 - 2×10^5 Zellen und in 6-Well-Kulturplatten à 2 ml/Well 12×10^4 Zellen je Well überführt. Die Kontrolle der gleichmäßigen Aussaat erfolgte mikroskopisch.

Das Passagieren der Zellkultur und deren Mediumwechsel wurden unter einem Sterilflow durchgeführt, um die Kontamination der Zellen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden.

3.2.3. Stimulation der HUVEC

Die Zellen wurden 72 h vor der Stimulation in 6 Well-Kulturplatten (für Western Blots) bzw. in 4 ml-Petrischalen (für Northern Blots) ausgesät. Die Kulturplatten bzw. Petrischalen wurden zuvor mit Kollagen beschichtet. Zwölf Stunden vor der Stimulation wurde das Kulturmedium gegen ein Hungermedium ausgetauscht, welches sich aus Basalmedium mit 1 % L-Glutamin und 0,4 % Penicillin /Streptomycin, sowie 0,4 % FCS zusammensetzte. So wurde ein Proliferationsstop der HUVEC erreicht. Die FCS-Konzentration wurde auf 0,4 % reduziert um mögliche Interferenzen mit den Stimulanzien zu minimieren. Zum Zeitpunkt der Stimulation zeigte die HUVEC-Kultur eine 90 %ige Konfluenz.

Der Mediumwechsel sowie die Zugabe der Stimulanzien nach 12 h Vorinkubation in Hungermedium erfolgte unter einem Sterilflow bei Raumtemperatur. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel des Stimulans, das ebenso bei Verdünnungsreihen als Verdünnungsmittel eingesetzt wurde. Die Konzentrationen lagen substanzabhängig zwischen 1 pg/ml und 10 µg/ml. Beendet wurde die Stimulation durch die Abnahme des Mediums und die Zelllyse. Nach Zeitkinetik ermittelt betrug die Standard-Inkubationszeit mit dem Stimulans für Northern Blots 24 h, für Western Blots 30 min (Abb. 6). Bei Zeitkinetiken einer Substanz wurden die Zellen mit einer bestimmten Konzentration für unterschiedliche Zeiträume

behandelt. Die Konzentration wurde anhand signifikanter Effekte der Substanz in der Dosis-Wirkungskurve festgelegt.

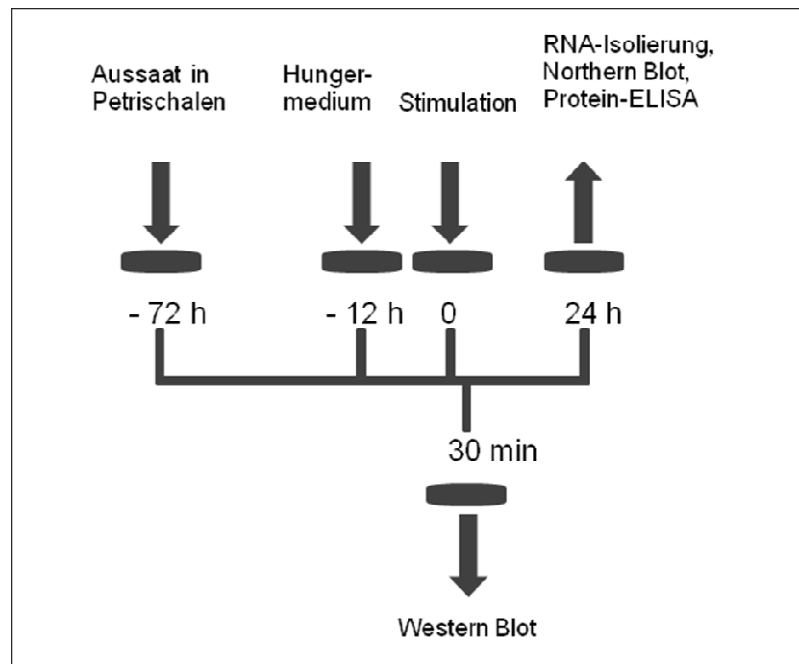


Abb. 6: Stimulation der HUVEC. Die HUVEC wurden 72 h vor Stimulation in Petrischalen (für Northern Blots) bzw. in 6-Well-Platten (für Western Blots) ausgesät. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gegen Hungermedium (FCS 0,4 %) ausgetauscht. Die Stimulation erfolgte nach weiteren 12 h. Für die Western Blot-Analyse wurden die HUVEC nach 30 min lysiert, die RNA-Isolierung für die Northern Blot-Analyse und Entnahme des Kulturüberstandes für den Protein-ELISA erfolgte 24 h nach Stimulans-Zugabe.

3.2.4. RNA-Isolierung aus HUVEC

Um aus einer geringen Menge von HUVEC eine relativ große Menge an RNA zu gewinnen, wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Das angewendete Prinzip ist eine Kombination der selektiven Bindungskapazitäten einer Membran auf Silikatgelbasis mit der Geschwindigkeit der Zentrifugaltechnik zur Isolierung von mRNA-Molekülen aus biologischen Proben.

Bei allen Versuchen mit RNA wurden Einmalhandschuhe getragen und diese häufig gewechselt. Die Materialien und Reagenzien für RNA-Versuche wurden

als solche gekennzeichnet und isoliert von anderen Chemikalien gelagert. Als Pipettenspitzen und Gefäße wurden bevorzugt Einwegartikel verwendet und diese durch Autoklavierung sterilisiert. Wiederverwendbare Glas- und Kunststoffgefäße wurden ebenfalls entsprechend präpariert. Glasgefäße wurden dazu über Nacht bei 200 °C gebacken, Gefäße aus Kunststoff wurden entweder mit 0,03 % Wasserstoffperoxid und anschließend mit destilliertem Wasser behandelt oder die RNasen mit Hilfe eines RNase-Erase-Sprays der Firma Biomedicals (Aurora, USA) entfernt. Alle Lösungen und Puffer wurden mit DEPC-Wasser in gebackenen Gefäßen angesetzt und autoklaviert (20 × SSC, 10 × MOPS, Methylenblau-Lösung, Farbstoffpuffer für RNA-Gele), um eine effektive RNase-Hemmung zu erreichen. Um die Stabilität der RNA zu gewährleisten, wurden die Arbeiten mit RNA grundsätzlich auf Eis durchgeführt und die Arbeitsgeschwindigkeit zügig gehalten. Alle Schritte der RNA-Isolierung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Isolierung wurde zu dem RPE-Puffer, der als Konzentrat geliefert wurde, das 4-fache Volumen an 99,8 % Ethanol zugegeben, sowie dem RLT-Puffer 14,3 M β -Merkaptoethanol (10 μ l β -ME auf 1 ml RLT-Puffer) zugefügt. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und für die spätere Proteinanalyse bei -20 °C aufbewahrt. Auf die HUVEC-Monolayer wurden dann je 4 ml-Petrischale 1400 μ l des RLT-Puffer / β -Merkaptoethanol-Gemisches gegeben, um die Zellen von dem Schalenboden zu lösen und die Zellwände zu zerstören. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren diente der Homogenisierung der Probe. Anschließend wurden jeweils 1400 μ l 70 %iges Ethanol hinzugegeben und mit dem Lysat vermischt. Die RNeasy-Säulen wurden jeweils in vier Etappen mit 700 μ l des Lysats beladen und dann für jeweils 1 min bei > 8000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach darauf folgendem Waschen mit 700 μ l RW1-Puffer, 15 sec bei > 8000 x g, wurde jede Säule auf ein neues Unterhütchen umgesetzt. Zwei weitere Waschungen mit jeweils 500 μ l RPE-Puffer folgten für 15 sec bei > 8000 x g. Um die Silica-Gel-Membran der Säulen zu trocknen, wurde nun für 2 min bei > 8000 x g zentrifugiert. Nach diesem Vorgang wurden die Säulen auf Eppendorf-Cups umgesetzt. Um die RNA in diese Gefäße zu eluieren, wurden nun 50 μ l RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und für

1 min bei $> 8000 \times g$ zentrifugiert. Das Eluat wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

3.2.5. Photometrische Quantifizierung der RNA

Um die eluierte RNA zu quantifizieren, wurde per UV-Spektralphotometrie die Konzentration ermittelt. Hierzu wurden $5\ \mu\text{l}$ des RNA-haltigen Eluats mit $95\ \mu\text{l}$ RNase-freien Wasser verdünnt, in eine Quarzküvette gegeben und in einem UV-Spektralphotometer das Absorptionsvermögen bei den Wellenlängen $\lambda = 260\ \text{nm}$ und $\lambda = 280\ \text{nm}$ gemessen. Als Referenz wurde RNase-freies Wasser verwendet. Zur Berechnung der Konzentration der RNA dient die Annahme, dass eine RNA-Lösung von $40\ \mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\ \text{nm}$ eine Absorption von $A_{260\text{nm}} = 1$ hat. Daraus ergibt sich eine Formel zur Berechnung der Konzentration (C) von RNA in wässriger Lösung:

$C\ [\text{ng}/\mu\text{l}] = A_{260\text{nm}} \times U \times V\ [\text{ng}/\mu\text{l}]$
--

Der Umrechnungsfaktor U entspricht bei RNA $40\ \mu\text{g} / \text{ml}$. V ist der Verdünnungsfaktor. Gleichzeitig gibt der Quotient $A_{260\text{nm}}$ zu $A_{280\text{nm}}$ einen Aufschluss über die Reinheit der entsprechend dem Grad der Kontamination mit Proteinrückständen. Ideal ist dabei ein Quotient von 1,6 - 2,0.

3.2.6. Northern Blot

Der Northern Blot ist eine molekularbiologische Methode zur Untersuchung der Genexpression mittels Übertragung (Blotten) gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Membran. Durch Kapillarkräfte wird die RNA aus dem Gel heraus auf eine reißfeste Nylonmembran gezogen und dort durch Quervernetzung festgehalten. Während des Transfers auf die Membran werden die relativen Positionen der RNA-Banden beibehalten, durch Hybridisierung mit komplementären Gensonden ist eine spezifische Markierung von RNA-Sequenzen möglich. So ist die RNA sowohl quantitativ, als auch qualitativ analysierbar.

Gelelektrophoretische Auftrennung der mRNA

Das Prinzip der Gelelektrophorese dient hier der Auftrennung von geladenen mRNA-Molekülen entsprechend ihrer Mobilität in einer Gelmatrix durch die Kraft, die ein angelegtes elektrisches Feld auf diese Moleküle ausübt. Die Mobilität der Moleküle ist bei gegebener Ladung und Feldstärke abhängig von deren Form und Größe, sowie dem Reibungswiderstand in der Gelmatrix. Der Formaldehydanteil im Gel wirkt denaturierend auf die mRNA und verhindert die Ausbildung einer ungünstigen Sekundärstruktur. Der Anteil an Agarose bestimmt die Durchlässigkeit des Gels und wird nach der zu erwartenden Fragmentgröße der mRNA-Fragmente gewählt. Je kleiner diese Fragmente sind, desto höher sollte die Agarose im Gel konzentriert sein. Somit werden die mRNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die Laufgeschwindigkeit der Größe proportional ist (Lehrach et al., 1977).

In Vorbereitung zur gelelektrophoretischen Auftrennung und anschließenden Blot wurden Proben mit 10 - 15 µg mRNA, die durch Isolierung aus HUVEC gewonnen wurden, in einer Vakuumzentrifuge mit angeschlossener Kühlfalle innerhalb von 40 min getrocknet. Resuspendiert wurden diese mit 14 µl eines Auftragspuffers, bestehend aus 350 µl Formamid, 160 µl Formaldehyd-Lösung (37 %) und 90 µl 10 × MOPS. Anschließend wurden basengepaarte Nukleotidabschnitte durch 5-minütiges Erhitzen auf 65 °C denaturiert und dann sofort wieder auf Eis gestellt, um eine erneute Ausbildung ungünstiger Sekundärstrukturen zu verhindern. Zwischen den Arbeitsschritten erfolgte ebenfalls eine Kühlung der Proben auf Eis.

Zur Herstellung des denaturierenden Agarose-Gels wurden zunächst 3 g Agarose in 144,5 ml DEPC-Wasser und 20 ml 10 × MOPS durch Erhitzen schlierenfrei gelöst, anschließend 35 ml Formaldehyd-Lösung hinzugegeben und diese zügig in einen Gelträger gegossen. Die einstündige Aushärtung des Gels erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Elektrophorese-Kammer wurde mit 140 ml 10 × MOPS und 1 l DEPC-Wasser als Laufpuffer gefüllt. Um das Stadium der Auftrennung während der Elektrophorese beurteilen zu können und um die mRNA-Proben zu beschweren

und somit in den Gelkammern zu halten, wurden den Proben vor Auftragung auf das Gel 6 μ l Farbstoffpuffer zugefügt. Die angelegte Spannung zur Elektrophorese betrug 130 V für die erste Stunde und 100 V für die zwei folgenden Stunden. Um eine gleichmäßige Verteilung der Ionen im Laufpuffer zu gewährleisten, wurde der Gelträger nach Ablauf der ersten Stunde alle 30 min um 180 Grad gedreht.

Northern Blot

Zur Äquilibration wurde das Gel nach Herausnahme aus dem Gelträger auf einem Horizontalschüttler für 25 min in 200 ml 20 x SSC geschwenkt. Ebenso wurde eine positiv geladene Nylonmembran behandelt, nachdem sie auf Gelgröße zugeschnitten und 2 min mit DEPC-Wasser gewässert worden war. Die Apparatur für den Blot bestand aus einem Glasblock, der, mit Chromatographiepapier bedeckt, in einer mit 20 x SSC gefüllten Glasschale stand. Das Chromatographiepapier war ebenfalls in 20 x SSC getränkt und stand mit dem der Glasschale in Verbindung. Das äquilibrierte Gel wurde mit der Vorderseite nach unten auf das Chromatographiepapier gelegt. Etwaige Luftblasen zwischen den Kontaktflächen wurden entfernt und das Gel an allen Seiten mit Folie abgeklebt, um einen direkten Kontakt der ober- und unterhalb des Gels liegenden Papiere zu verhindern. Auf das Gel wurde die äquilibrierte Nylonmembran ebenfalls mit der Vorderseite nach unten gelegt und auch hier auf eine vollständige Entfernung von Luftblasen geachtet. Darauf wurden vier Lagen Chromatographiepapier und zuoberst ein 5 cm hoher Stapel Papiertücher geschichtet. Zusätzlich wurde die Apparatur mit einem 1 kg-Gewicht gleichmäßig beschwert. Geblottet wurde per Kapillarblot über 24 h bei Raumtemperatur. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Papiertücher zusammen mit dem Chromatographiepapier auf der Membran entfernt. Die Nylonmembran wurde mit der Vorderseite nach oben für 1 min in 100 ml 2 x SSC geschwenkt und anschließend die RNA mit Hilfe eines UV-Crosslinkers bei 1200 μ J fixiert. Um bereits vor Darstellung von RNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit radioaktiven cDNA-Sonden die RNA beurteilen zu können, wurde diese mit Methylenblau angefärbt. Dazu wurde die Nylonmembran nun zuerst für 15 min in 5 %iger Essigsäure geschwenkt, dann für 5 min in Methylenblau-Lösung und zuletzt zweimal jeweils 3 min mit DEPC-Wasser gewaschen. Nach Trocknung der Nylonmembran wurde diese in einem

Hybridisierungsbeutel vor Licht geschützt aufbewahrt und zur Dokumentation mit einem kommerziellen Photokopiergerät abgelichtet.

3.2.7. Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

cDNA-Sonden

Verwendet wurde eine OPG-cDNA Sonde, um drei OPG-mRNA-Formen (2,9 kb, 4,2 kb, 6,5 kb) nachzuweisen. Durch RT-PCR wurde diese aus einer Gesamt-cDNA (1356 bp) primärer humaner Osteoblasten mit den Primerpaaren (sense: 5' ACCTTGAATTTCAGTATATATAACGTGATGAGCG 3' und anti-sense: 5' ACCTTGAATTCATTATCATCCATGGGATCTCGC 3') und unter Verwendung einer EcoRI-Schnittstelle amplifiziert und in den pGEM-T easy-Vektor (Promega, Madison, USA) einkloniert. Nach Herstellung eines 4,4 kbp pGEM-OPG Expressionsvektors erfolgte die Amplifikation in *Escherichia coli* JM 109 und die Präparation der Plasmide. Das pGEM-OPG wurde mit *EcoRI* verdaut und anschließend die OPG-cDNA-Sonde unter Verwendung des Wizard DNA purification Kit von Promega (Madison, USA) gereinigt (Hofbauer et al., 1998). Zur Quantifizierung der im Northern Blot Verfahren auf eine Membran aufgetragenen OPG-mRNA wurde die cDNA-Sonde des Housekeeping-Gens β -Aktin von Clontech (Palo Alto, USA) verwendet. Housekeeping-Gene sind konstitutiv von jedem Zelltyp exprimierte Gene, deren Transkriptionsrate von einer exogenen Stimulation der Zellen weitgehend unabhängig ist.

Radioaktive Markierung der cDNA

Zur radioaktiven Markierung der cDNA wurde das DECAprime II DNA Labelling Kit der Firma Ambion (Austin, USA) verwendet. Das Prinzip basiert auf einer Methode der Synthese komplementärer DNA-Stränge unter Einbau eines radioaktiven [α -³²P]-dCTP-Nukleotids. Dabei wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge denaturiert. An diese binden decamere Primer, die einer DNA-Polymerase I (Klenow) mit fehlender 5'→3'-Aktivität als Initiationsstelle zur Synthese des komplementären DNA-Stranges dienen (Feinberg und Vogelstein,

1983). Durch Hybridisierung der Northern Blots mit dieser radioaktiv-markierten cDNA-Sonde ist der Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen möglich.

Als Reaktionsansatz wurden 10 µl Nuklease-freies Wasser, 1 µl cDNA und 2,5 µl 10 × Decamer in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben, durchmischt, zentrifugiert und durch 5-minütiges Erhitzen bei 95 °C die DNA denaturiert. Es folgte die sofortige Kühlung auf Eis und Zugabe von 5 µl 5 × Puffer-dCTP. Die folgenden Arbeitsschritte wurden in einem für die Arbeit mit radioaktiven Nukleotiden speziell ausgestatteten Raum durchgeführt. Zu dem Ansatz wurden nun 5 µl [α -³²P]-dCTP und 1,5 µl Klenow-DNA-Polymerase I pipettiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zur Säuberung der cDNA-Sonde von nicht-eingebauten Nukleotiden wurde das „Push columns“-Säulensystem der Firma Stratagene verwendet. Nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie werden hierbei frei Nukleotide an das Austauschharz der Säulen gebunden, DNA einer Länge von 17 bp - 50 kbp passiert dieses ungehindert (Sambrook et al., 1989). Um diese DNA zu äquilibrieren, wurden die Säulen zum Schutz vor radioaktiver Strahlung in einer Apparatur aus Plexiglas eingespannt und die 70 µl 1 × STE-Puffer mit Hilfe einer luftgefüllten 10 ml-Spritze durch die Säulen gedrückt. Die radioaktive Probe wurde nun auf die Säulen gegeben und unter Benutzung einer luftgefüllten 10 ml-Spritze hindurchgedrückt, sowie unten in einem Eppendorfcup aufgefangen. Zur vollständigen Elution der cDNA folgten weitere Durchgänge mit einmal 70 µl 1 × STE-Puffer und zweimal 10 ml-Luftboli. Die cDNA-Probe wurde bis zur Verwendung zur Northern-Hybridisierung in einem Isolationsgefäß für Radioaktivität bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.8. Hybridisierung

Die Hybridisierung von gelelektrophoretisch aufgetrennter und anschließend im Northern Blot-Verfahren auf einer Membran fixierten RNA ist ein sensitives Verfahren zum Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen. Diese werden mittels radioaktiv markierter cDNA-Sonden lokalisiert und durch Autoradiographie nachgewiesen (Alwine et al., 1977; Bonner, 1987; Meinkoth und Wahl, 1984; Thomas, 1980).

In der Vorbereitung wurden der Hybridisierungssofen auf 68 °C vorgeheizt und die Hybridisierungslösung und Hybridisierungsflaschen ebenfalls auf diese Temperatur gebracht. Zusammen mit 15 ml der Hybridisierungslösung wurde die Nylonmembran in die Hybridisierungsflasche gegeben und für 30 min bei 68 °C im Ofen inkubiert. Eine gleichmäßige Benetzung der Membran wurde dabei durch kontinuierliche Rotation der Hybridisierungsflasche gewährleistet. Die radioaktiv markierte cDNA-Sonde wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Die Hybridisierungslösung wurde nach der 30-minütigen Inkubationszeit wieder aus der Hybridisierungsflasche entfernt und durch 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt, denen zuvor 10 - 20 µl der Probe radioaktiver cDNA-Sonde, je nach Radioaktivität der Probe, zugesetzt worden waren. Weitere 60 min Inkubation der Nylonmembran im Ofen unter kontinuierlicher Flaschenrotation folgten. Anschließend wurde der Ofen auf 50 °C gekühlt, während dessen außerhalb des Ofens der Waschvorgang der Nylonmembran begonnen wurde. Um die nicht-gebundenen cDNA-Sonden zu entfernen, wurde die Nylonmembran zunächst bei Raumtemperatur zweimal für 10 min in jeweils 500 ml Waschlösung 1 ($2 \times \text{SSC}$; 0,05 % SDS) auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Darauf folgte die Waschung mit der auf 50 °C vortemperierten Waschlösung 2 ($0,1 \times \text{SSC}$; 0,1 % SDS) in einer neuen Hybridisierungsflasche im Ofen für zweimal je 40 min bei 50 °C. Die Nylonmembran wurde kurz mit Chromatographie-Papier angetrocknet, in einem Hybridisierungsbeutel platziert und dieser zugeschweißt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und diese in einer Kassette mit beidseitigen Verstärkerfolien für 24 h bei -80 °C exponiert. Je nach Filmschwärzung wurde ein neuer Film aufgelegt und die Expositionszeit bestimmt. Diese lag bei OPG-Hybridisierung bei vier Tagen bis eine Woche, bei β -Aktin-Hybridisierung bei 1 - 4 h.

Dehybridisierung

Um eine erneute Hybridisierung der mRNA auf der Nylonmembran durchführen zu können, musste zuvor die gebundene radioaktive cDNA-Sonde wieder entfernt werden. Hierzu wurde eine Lösung aus 500 ml DEPC-Wasser und 12,5 ml 20 % SDS auf 90 °C erhitzt und die Nylonmembran darin für 10 min geschwenkt. Es folgten weitere 10 min Schwenken in der Lösung bei Raumtemperatur. Die

Nylonmembran wurde anschließend wieder in einem Hybridisierungsbeutel platziert und bis zur erneuten Hybridisierung bei 4 °C gelagert.

3.2.9. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine aus Proteinextrakten. Dabei werden Proteinextrakte in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht getrennt und durch anschließendes Blotten auf eine Membran übertragen. Proteine (Antigen) können nun mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden, die wiederum mit radioaktiv-markierten Antikörpern gekoppelt werden und per Autoradiographie visualisiert werden. Dies erlaubt eine quantitative Beurteilung der Expression bestimmter Gene.

Vorbereitung

Das Zellmedium wurde vollständig aus den Vertiefungen der 6-Well-Zellkulturplatte entfernt und für die Proteinanalyse per ELISA bei -20 °C tiefgefroren. In jedes Well wurden nun 70 µl des zuvor angesetzten Lyse-Puffers pipettiert, diese jeweils mit Einmalschabern gründlich ausgeschabt und das Zelllysate sofort in Eis-gekühlte Eppendorfhütchen überführt. Nach anschließendem Sonifizieren der Lysat-Proben folgte 5-minütiges Zentrifugieren bei > 8000 x g, um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen.

Während der Arbeit mit Proteinextrakten wurde stets auf eine gute Kühlung der Proben und ein zügiges Arbeitstempo geachtet, um die Proteolyse durch Proteasen möglichst gering zu halten.

Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford

Pro Vertiefung einer 96-Well-Kulturplatte wurden 250 µl Bradford-Lösung (Stocklösung von der Firma BioRad, Hercules, USA; Verdünnung 1:5 mit Aqua dest) vorgelegt. Für die Proteinstandard-Lösungen wurde aus einer Stocklösung 1 mg/ml BSA in H₂O eine Verdünnungsreihe, durch Zugabe von 0, 1, 2, 4, 6 und 8 µl in Doppelwerten zu der vorgelegten Bradford-Lösung (Bradford, 1976),

erstellt. Deren Messwerte bildeten die Eichkurve für die Bestimmung der Protein-Konzentrationen der Proben, von denen jeweils 2 µl in Doppelwerten in die vorbereiteten Wells pipettiert wurden. Nach Mischen und 15 min Inkubation wurde in einem Mikrotiterplattenphotometer die Extinktion bei $\lambda = 570$ nm gegen aqua dest gemessen.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zunächst wurden die Proteinextrakte in einem Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigen Puffer, dem Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) für 5 min bei 100 °C denaturiert. Die Lösung wurde je Probe aus 20 µl 5 x Laemmli-Puffer und 60 µl DEPC-Wasser/Protein-Gemisch mit einer Gesamtkonzentration an Protein von ca. 2 µg/µl angesetzt. Durch das starke Erhitzen werden die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst und zusätzlich durch das im Puffer enthaltene β -Merkaptoethanol die Disulfidbrücken gespalten. Die Homogenisierung der Proteinladung durch Anlagerung anionischer Moleküle des SDS an die entfaltenen Proteine schafft die Grundlage für die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach ihrem Molekulargewicht.

Zur Herstellung einer 12 % SDS-PAGE wurden zunächst die Glasplatten und Spacer der Gelapparatur mit Ethanol gereinigt, in der Halterung eingespannt und mit Klammern fixiert. Um eine vorzeitige Polymerisation zu vermeiden, wurden die Gellösungen auf Eis zubereitet und TEMED (N, N, N, N, Tetramethyl-ethylendiamin) jeweils erst kurz vor Ausguss des Gels zu der Lösung zugegeben. Als erstes wurde das Stoppgel (200 µl Trenngel-Lösung [12 %], 1 µl APS [10 % Ammoniumperoxiddisulfat in aqua dest], 1 µl TEMED) zwischen die Platten gegossen, durch Schwenken verteilt und für 10 min gehärtet. Anschließend wurden ca. 2/3 der Platte mit dem Trenngel (4 ml Trenngel-Lösung [12 %], 12,5 µl APS, 6,25 µl TEMED), das letzte 1/3 mit dem Sammelgel (2,5 ml Sammelgel-Lösung [12 %], 20 µl APS, 5 µl TEMED) vollgegossen und der Ethanol-gesäuberte Kamm eingesteckt. Nach 45 min Aushärtungszeit wurde der Kamm gezogen, die Platten in die Laufkammer eingespannt und diese außen und innen (bis über die Taschenöffnungen) mit Laufpuffer gefüllt. Als Standard wurden 7 µl Marker in die erste Tasche gegeben, in die folgenden je 20 µl der

zuvor zentrifugierten Proteinproben. Die Elektrophorese wurde bei 125 Volt für 15 min bis Erreichen des Trenngels und von dort an für weitere 45 min bei 160 Volt durchgeführt.

Western Blot

Für den Geltransfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurden Gel und die Membran zunächst für 5 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Es folgte die Schichtung, geblottet wurde bei 4 °C bei 300 mA und 500 V für 1 h. Nach Herausnehmen aus der Blot-Kammer wurde die Membran auf Gelgröße zugeschnitten, für 10 min getrocknet und dann für 1 h bei Raumtemperatur in 25 ml Blockierungspuffer geschwenkt. Die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen P-STAT6 (Tyr641) bzw. Kontroll-STAT6 erfolgte in einer Lösung aus 10 ml Antikörper-Lösungspuffer und 10 µl Antikörper (Verdünnung 1:1000) über Nacht bei 4 °C.

Detektion

Die Signal-Detektion erfolgte unter Nutzung eines Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase)-konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers und Chemilumineszenz-Reaktion. Dazu wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 10 ml Milch-TBS/T mit 1 µl anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) unter leichtem Schwenken inkubiert, anschließend mit Waschpuffer 3 x 15 min gewaschen und dann für 5 min in eine spezielle Detektionslösung gelegt. Zur Darstellung des Ergebnisses wurde die Membran initial für 1 min in einer Filmkassette einem Röntgenfilm exponiert, sowie ein zweites Mal entsprechend gewünschter Signalintensität erneut exponiert.

3.2.10. OPG-Proteinanalyse

Zur Proteinanalyse des von HUVEC ins Zellkulturmedium freigesetzten OPGs wurde der Osteoprotegerin ELISA Kit der Firma Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland) eingesetzt. Dieser besitzt eine Nachweisgrenze für OPG von

0,14 pmol / l und der Inter-Assay Variationskoeffizient beträgt 6 - 8 %. Es handelt sich hierbei um einen ELISA nach dem Sandwich-Prinzip. Verwendet werden zwei spezifische Antikörper gegen OPG, wobei der Bindeantikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gekoppelt ist. Dieser bindet das OPG in der Probe. Der lösliche, biotinylierte Detektionsantikörper lagert sich von der anderen Seite her an das OPG an. Unspezifisch gebundenes Material wird durch einen Waschgang entfernt. Über ein Streptavidin-Peroxidase/TMB-System wird das OPG quantifiziert. Es erfolgt eine photometrische Messung der Absorption der chromogenen Verbindung bei 450 nm und parallel dazu die Erstellung einer Standardkurve der Absorptionen versus bekannter Standardkonzentrationen (25; 12,5; 6,25; 3,13 pmol/l). Hieraus werden die Konzentrationen der Proben ermittelt.

In Vorbereitung des ELISAs wurde das Waschpufferkonzentrat 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde die OPG-Stocklösung (500 pmol / l) mit Zellkulturmedium 1:20 vorverdünnt, dieser Ansatz diente als Standard mit der höchsten Konzentration ($S_1 = 25$ pmol/l). Ausgehend von dieser Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:2 Verdünnungsschritten ($S_2 = 12,5$ pmol/l, $S_3 = 6,25$ pmol/l, $S_4 = 3,13$ pmol/l) und reinem Zellkulturmedium ($S_5 = 0$ pmol/l) hergestellt. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 μ l Assaypuffer vorgelegt und 50 μ l Standard in Doppelwerten sowie die Proben in Dreifachwerten hinzupipettiert. Nach Zugabe von jeweils 50 μ l des löslichen Detektionsantikörpers in die Vertiefungen wurde die Mikrotiterplatte nach vorsichtigem Durchmischen 18 - 24 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte verworfen, diese fünfmal mit je 300 μ l Waschpuffer gewaschen und nach der letzten Waschung auf Saugpapier ausgeschlagen. Im nächsten Schritt wurden je 200 μ l Konjugat (Streptavidin, Peroxidase-markiert) in die Vertiefungen pipettiert, nachfolgend die Mikrotiterplatte 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und nach abgelaufener Inkubationszeit erneut dem Waschvorgang unterzogen. Nach diesem zweiten Waschgang wurden 200 μ l TMB (Tetramethylbenzidin)-Lösung in die Vertiefungen gegeben, die die Quantifizierungsreaktion auslösten. Diese stellt sich als OPG-konzentrationsabhängige Blaufärbung der Lösung dar. Nach 15 - 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch die Zugabe von 50 μ l

Stopplösung je Vertiefung die Reaktion unter Farbumschlag von blau nach gelb beendet. Nach kurzem Mischen wurde sofort die Extinktion in einem Mikrotiterplattenphotometer bei $\lambda = 450$ nm gegen eine Referenzwellenlänge $\lambda = 690$ nm gemessen. Ergab sich bei den Proben eine OPG-Konzentration höher als der höchste Standard, so wurden diese mit Waschpuffer verdünnt und einem zweiten Assay unterzogen.

3.2.11. Osteoklasten-Assay

Reife Osteoklasten sind große multinukleäre Zellen und repräsentieren die zellulären Hauptakteure der aktiven Knochenresorption. Spezifische Signale und Mediatoren induzieren ihre Differenzierung aus monozytären Vorläuferzellen des hämatopoietischen Systems. Zur Analyse der Osteoklastenentwicklung und der Messung und Quantifizierung der Knochenresorption unter verschiedenen Bedingungen *in vitro* wurde das Poietics osteoclast precursor (OCP)-System der Firma Cambrex verwendet. In diesem Osteoklasten-Assay differenzieren osteoklastäre Vorläuferzellen (OCP) in einem speziellen Differenzierungsmedium unter Zusatz von M-CSF (33 ng/ml) und RANKL (66 ng/ml) zu reifen, aktiv resorbierenden multinukleären Osteoklasten.

Die ausdifferenzierten Osteoklasten bauen mit Hilfe der von ihnen sezernierten Metalloproteinasen die spezielle Oberflächenbeschichtung der Assay-Kulturplatte ab und setzen dabei Europium-gekoppelte Kollagen-Typ 1-Fragmente in den Kulturüberstand frei (Delaisse et al., 2003), deren Fluoreszenz fluorimetrisch bestimmt werden kann.

Nach 11-12 Tagen Kultur erfolgte nach qualitativer Beurteilung der Zell-Kultur im Osteoklasten-Assay die quantitative Analyse durch Fluoreszenz-Bestimmung der Menge der jeweils in den Kulturüberstand freigesetzten fluoreszierenden Kollagen-Fragmente (RFU; Released fluorescent units). Die gemessene Fluoreszenz des Kulturüberstandes eines jeden Wells ist zu der Anzahl reifer Osteoklasten und ihrer Resorptionsaktivität direkt proportional und kann daher zur quantitativen Beurteilung der Osteoklastendifferenzierung herangezogen werden.

Prinzip des Osteoklasten-Assays

Die Arbeiten mit den osteoklastären Vorläuferzellen erfolgten unter dem Sterilflow. Für den Ansatz der Osteoklasten-Vorläufer-Zellkultur wurden dem Basal-Medium die Bestandteile Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg / ml), 10 % FBS und 2 mM L-Glutamin aus dem Growth-Medium SingleQuot-Kit zugesetzt. Dieses supplementierte Basal-Medium (sBM) wurde zum Auftauen der in Flüssigstickstoff gefrorenen osteoklastären Vorläuferzellen, sowie als Basis für die Generierung der verschiedenen Kulturbedingungen durch unterschiedliche Zusammensetzung des Kulturmediums verwendet.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese in ihrem Behälter und auch das sBM im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und anschließend die Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Unter tropfenweiser Zugabe von insgesamt 5 ml sBM wurden die Zellen durch vorsichtiges Mischen des Röhrchens in dem Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde drei Minuten lang fortgeführt und weitere 10 min unter Zugabe von sBM bis zu einem Gesamtvolumen von 40 ml vollzogen. Nach der folgenden 15-minütigen Zentrifugation bei 200 x g bei Raumtemperatur wurde das Zellpellet in 3 ml des Überstandes resuspendiert und das Volumen mit frischem sBM auf 10 ml tropfenweise wieder aufgefüllt. Der Auftau-Vorgang wurde durch eine weitere Zentrifugation für erneute 15 min bei 200 x g bei Raumtemperatur und abschließende Resuspension in 1 ml des Überstandes abgeschlossen. Diese Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von ca. 1 Mio. Zellen/1 ml sBM konnte nun für die Aussaat in die Wells der Osteoklasten-Assay-Kulturplatte verwendet werden.

Die osteoklastären Vorläuferzellen wurden zu ca. 10^4 Zellen/Well in jeweils 200 µl Kulturmedium auf die 96-Well-Kulturplatte des Osteoklasten-Assays ausgesät (10 µl Zellsuspension in 200 µl Kulturmedium), die als humane Knochenmatrix eine Europium-gekoppelte Kollagen Typ-1-Beschichtung aufwies. Die Kulturdauer erfolgte über insgesamt 11-12 Tage im Brutschrank bei 37 °C und in 5 %igem CO₂.

Die Zusammensetzung des Kulturmediums wurde je nach zu analysierender Bedingung variiert. Für eine maximale Differenzierungsrate der Zellen in diesem

Assay war der Zusatz von RANKL und M-CSF mit einer Endkonzentration von 66 ng/ml (1 RANKL-SingleQuot in 29 ml sBM) und 33 ng/ml (1 M-CSF SingleQuot in 30 ml sBM) zum sBM notwendig. Bei der Analyse der Zelldifferenzierung unter Exposition mit dem in HUVEC-Kulturen gewonnenen Kulturüberstandes wurden die osteoklastären Vorläuferzellen in einem Kulturmedium kultiviert, das sich zu gleichen Teilen aus sBM und HUVEC-Kulturüberstand zusammensetzte. Die RANKL- und M-CSF-Zusätze wurden dabei so konzentriert, dass die Endkonzentrationen von 66 ng/ml RANKL und 33 ng/ml M-CSF gewährleistet waren (Abb. 7). Die Kultur und Stimulation der HUVEC erfolgte wie unter 3.2.2. und 3.2.3. beschreiben. Der Kulturüberstand wurde bis zur weiteren Verwendung im Osteoklasten-Assay bei -80 °C tiefgefroren.

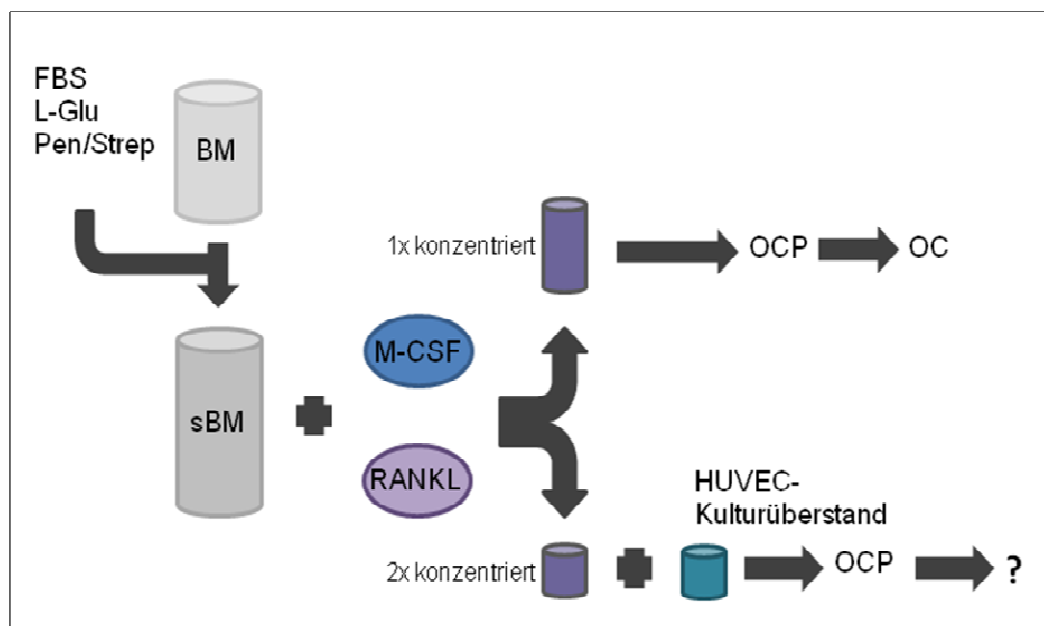


Abb. 7: Ansatz des Osteoklasten-Assays. Dem Basalmedium (BM) wurden Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (100 µg / ml), 10 % FBS und 2 mM L-Glutamin zugesetzt. Diesem supplementierten Basalmedium (sBM) wurden weiterhin M-CSF (33 ng/ml) und RANKL (66 ng/ml) beigelegt. Osteoklasten-Vorläuferzellen (OCP) differenzierten in diesem Kulturmedium zu reifen Osteoklasten (OC). Untersucht wurde der Einfluss von HUVEC-Kulturüberstand auf die Differenzierung und die Aktivität der Osteoklasten.

Am 7. Tag der Kultur erfolgte eine Erneuerung des Kulturmediums zu denselben Bedingungen wie bei Ansatz der Kultur. Ab diesem Zeitpunkt war eine Charakterisierung der Zellen nach morphologischen Kriterien unter dem Lichtmikroskop möglich.

Die fluorimetrische Quantifizierung der in den Kulturüberstand freigesetzten Europium-gekoppelten Kollagen-Fragmente wurde nach 11-12 Tagen Kultur durchgeführt. Hierzu wurde eine schwarze 96-Well-Assay-Platte verwendet. Pro Well wurden raumtemperierte 200 μ l Fluophore releasing reagent (Cambrex) vorgelegt und jeweils 10 μ l Kulturüberstand entsprechend der Anordnung im Osteoklasten-Assays zugefügt und vorsichtig gemischt. Die Fluoreszenz in einem jeden Well (RFU) wurde mittels eines Fluorimeters (FLUOstar Galaxy der Firma BMG Labtechnologies; Offenburg) bei einer Anregung bei 340 nm und Emission bei 612 nm bestimmt. Die Messung erfolgte über eine Periode von 400 μ s nach einer initialen Pause von ebenfalls 400 μ s als 5-fach-Messung je Well.

3.2.12. Berechnungen und statistische Auswertungen

Die numerischen Werte der OPG-Proteinmessungen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von Dreifachbestimmungen angegeben. Die dreifache Bestimmung der Proben zur Analyse erfolgte, um den Fehler bei der Messung möglichst gering zu halten. Des Weiteren wurden die Messwerte in der Auswertung der Ergebnisse zur Absorption der mit RNase-freiem Wasser eluierten RNA bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm ($A_{260\text{nm}}$ -Wert) in Bezug gesetzt. Der $A_{260\text{nm}}$ -Wert wurde im Rahmen der RNA-Isolierung für den Northern Blot bestimmt (Kapitel 3.2.5). Aus dieser Absorption ließ sich die Menge an eluierter RNA zur Normalisierung auf Unterschiede der Zellkulturen berechnen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der gemessenen OPG-Konzentration und der Anzahl OPG-sezernierender Zellen. Die $A_{260\text{nm}}$ -Werte wurden zur jeweiligen Kontrolle mit 1,0 ins Verhältnis gesetzt, der Mittelwert der drei Protein-Messwerte und ihre Standardabweichung durch diesen Wert dividiert. Dies diente zur Korrektur für unterschiedliche Zellzahlen als Fehlerquelle in der vergleichenden Analyse von Proteinkonzentrationen.

Die numerischen Werte der Europium-Kollagen-Fluoreszenz-Messung der Osteoklasten-Assays ergaben sich durch Mittelwert-Bildung aus fünffacher Bestimmung der Fluoreszenz (RFU) mit 10 Lichtblitzen je Messung angegeben. Zur Analyse wurden wiederum die Mittelwerte der Fluoreszenz-Messung aus Dreifachtestung der jeweiligen Bedingung und deren Standardabweichung herangezogen. Die fünffache Bestimmung der Proben erfolgte, um den Fehler bei der Messung möglichst gering zu halten, die Dreifachtestung der Bedingungen erfolgte, um Variationen der Zellkulturen je Well zu berücksichtigen.

Zur Überprüfung der Mittelwertdifferenz zweier Testbedingungen unter Annahme der Nullhypothese wurde der T-Test angewandt. Es wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % bzw. einer Irrtumswahrscheinlichkeit (α -Fehler) von 5 % gearbeitet. Ergab der T-Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ (Signifikanzgrenze $p < 0,05$), wurde eine systematische Differenz der verglichenen Mittelwerte angenommen. Der α -Fehler bedeutet eine fälschliche Ablehnung dieser Nullhypothese.

Zeitkinetiken und Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden mittels Varianzanalyse für Vielfachmessungen (ANOVA) analysiert, wobei alle Mittelwerte miteinbezogen wurden. Auch hier lag die Signifikanzgrenze bei $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse der Osteoprotegerin-Produktion in humanen umbilikalen Endothelzellen *in vitro*

Als Modell ausdifferenzierter und stoffwechselaktiver Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnurvenen isolierte Endothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) verwendet. Frühere Studien belegen eine basale OPG-mRNA-Expression und OPG-Protein-Sekretion dieser Zellen (Zannettino et al., 2005). Zur Charakterisierung der OPG-Regulation in HUVEC wurden Zytokine, Hormone und Medikamente eingesetzt. Die Analyse der OPG-mRNA-Spiegel erfolgte durch Northern Blot, durch einen ELISA wurde die OPG-Proteinsekretion beurteilt. Die Semiquantifizierung der mRNA erfolgte über das Housekeeping-Gen β -Aktin.

4.1.1. STAT6-abhängige Regulation der Osteoprotegerin-Produktion durch die T_H2 -Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 in humanen Endothelzellen

Bei Exposition von HUVEC über 24 h mit IL-4 und IL-13 in den Dosierungen zwischen 1 pg/ml und 10 ng/ml induzieren beide Zytokine eine dosisabhängige Steigerung der basalen OPG-mRNA-Spiegel. Diese Steigerung ist unter IL-4-Exposition stärker ausgeprägt, als unter IL-13-Exposition (Abb. 8).

Der Stimulationseffekt der Zytokine war zudem zeitabhängig mit einer deutlichen Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel nach 24-stündiger Exposition mit 10 ng/ml IL-4 bzw. IL-13. Der Effekt war nach 48 h noch ausgeprägter nachweisbar. Die OPG-Protein-Sekretion der HUVEC wurde durch Exposition der Endothelzellen über 48 h mit 10 ng/ml IL-4 um das 4-fache ($p < 0,0001$ mit ANOVA) und mit 10 ng/ml IL-13 um das 3-fache ($p < 0,001$ mit ANOVA) gesteigert.

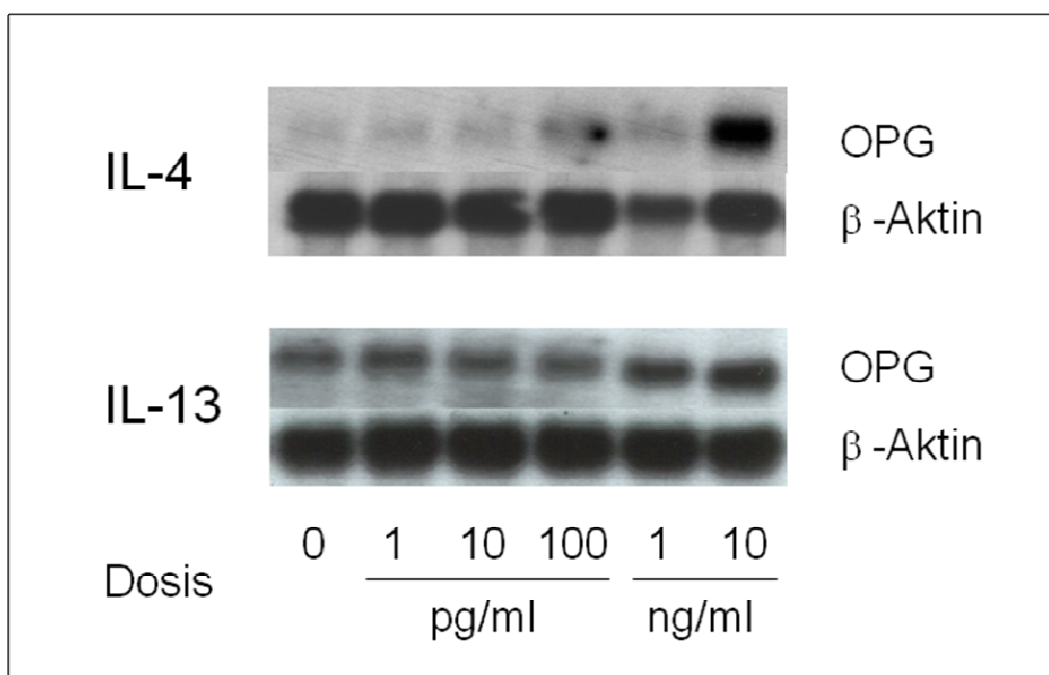


Abb. 8: Dosisabhängige Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel durch IL-4 und IL-13. Die HUVEC wurden für 24 h mit IL-4 und IL-13 in den Konzentrationen 1, 10, 100 pg/ml und 1, 10 ng/ml inkubiert. Die Northern Blot-Analyse zeigt die Expression von OPG-mRNA (2,9 kb) und β-Aktin-mRNA (2,0 kb).

Zur detaillierteren Charakterisierung der intrazellulär durch IL-4 und IL-13 aktivierten Signaltransduktionskaskade wurde diese auf eine Beteiligung von Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) analysiert. Es ist bekannt, dass IL-4 und IL-13 diesen latenten Transkriptionsfaktor aktivieren können (Palmer-Crocker et al., 1996; Andrews et al., 2002) und STAT6 unter anderem in koronararteriellen Muskelzellen (CASM) an der Modulation der OPG-Expression beteiligt ist (Hofbauer et al., 2006).

Die Aktivierung von STAT6 über Phosphorylierung zum Phospho(P)-STAT6 wurde per Western Blot analysiert, wobei sich die basale Menge des aus HUVEC-Lysat gewonnenen inaktiven STAT6 reziprok zum Ausmaß der Phosphorylierung zu P-STAT6 verringert. Sowohl unter Exposition der HUVEC mit IL-4 als auch unter Exposition mit IL-13 (Expositionszeit jeweils 30 min) lässt sich eine dosisabhängige Steigerung der Phosphorylierungsrate von STAT6 zu P-STAT6 nachweisen. IL-4 aktiviert bereits ab einer Konzentration von 10 pg/ml erkennbar

STAT6 und dieser Effekt kann durch Dosiserhöhung (bis 10 ng/ml) des applizierten IL-4 noch weiter gesteigert werden. IL-13 aktiviert dagegen erst ab einer Dosis von 1 ng/ml erkennbar STAT 6 in HUVEC und eine Maximierung dieses Effektes kann durch ein 10-faches dieser Dosis erreicht werden (Abb. 9).

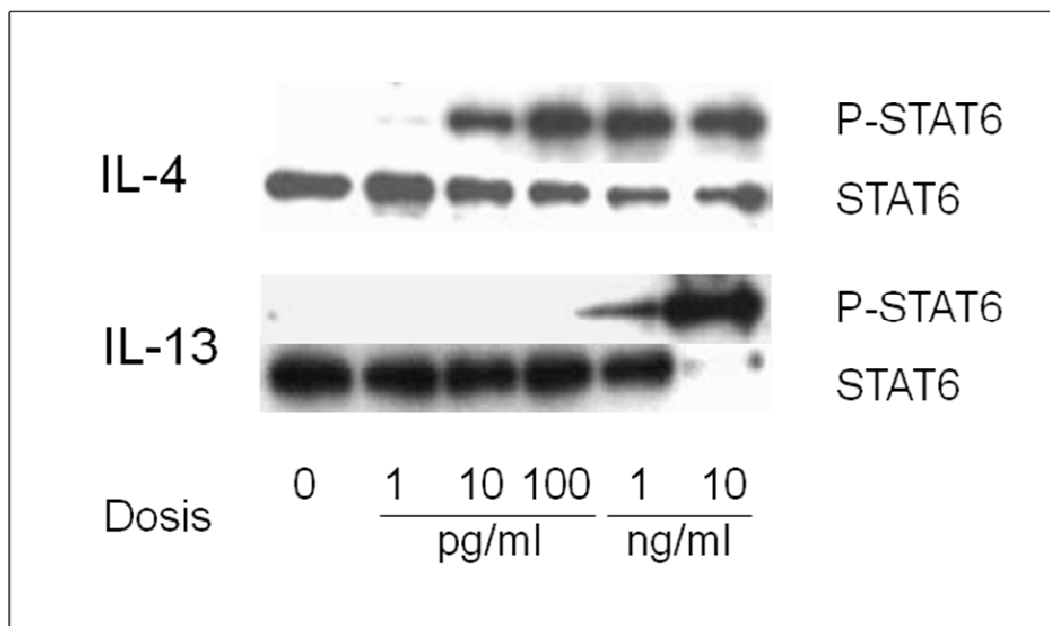


Abb. 9: Dosisabhängige Stimulation der STAT6-Phosphorylierung durch IL-4 und IL-13. HUVEC wurden für 30 min mit IL-4 bzw. IL-13 in den Konzentrationen 1, 10, 100 pg/ml und 1, 10 ng/ml inkubiert. Die Western Blot-Analyse zeigt die Phosphorylierung von STAT6 zu Phospho-STAT6. Es wurden jeweils 6 x 35 µg Protein aus HUVEC-Lysat auf die Nitrocellulosemembranen übertragen.

Die Phosphorylierungsrate von STAT6 zu P-STAT6 nimmt sowohl in Abhängigkeit von der eingesetzten Interleukindosis als auch in Abhängigkeit von der Expositionszeit bei konstanter Zytokindosis (10 ng/ml IL-4 bzw. IL-13) zu. Zum Zeitpunkt 0 (Kontrolle) ist nur inaktives STAT6, jedoch kein aktives P-STAT6 in der Western Blot-Analyse nachweisbar. Eine Phosphorylierung zu P-STAT6 unter Exposition mit IL-4 ist erstmalig und gleichzeitig maximal nach 10 min zu beobachten. Nach 30 min geht dieser Effekt zurück. Die Phosphorylierung von STAT6 unter Exposition mit IL-13 setzt im Vergleich zu IL-4 verzögert ein. Es ist ebenfalls erstmalig nach 10 min aktives P-STAT6 nachzuweisen, jedoch zeigt sich eine maximale Phosphorylierung erst während

einer Expositionszeit von 30 min bis 1 h. Anschließend erfolgt auch hier eine Abnahme der Signalstärke. Sowohl unter Exposition mit IL-4 als auch mit IL-13 ist ohne erneute Zytokin-Applikation nach einer maximalen Expositionszeit von 4 h immer noch P-STAT6 nachweisbar (Abb. 10).

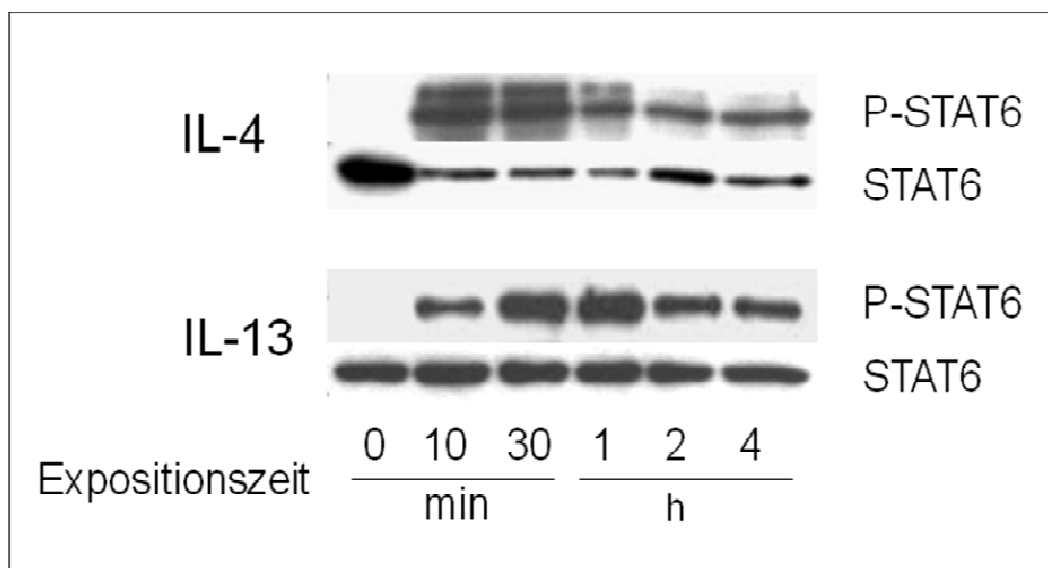


Abb. 10: Zeitabhängige Stimulation der STAT6-Phosphorylierung durch IL-4 und IL-13. Die Western Blot-Analyse zeigt die Phosphorylierung von STAT6 zu Phospho-STAT6. Das HUVEC-Lysat wurde zum Zeitpunkt 0 sowie nach 10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h Exposition mit 10 ng/ml IL-4 bzw. 10 ng/ml IL-13 gewonnen. Es wurden jeweils 6 × 35 µg Protein aus HUVEC-Lysat auf die Nitrocellulosemembranen übertragen.

4.1.2. IL-4-Rezeptor-spezifische Signaltransduktion der IL-4-induzierten STAT6-Aktivierung und Osteoprotegerin-Expressionssteigerung

Zum Nachweis, dass die OPG-Expression durch Bindung von IL-4 an seinen spezifischen Rezeptor induziert wird, wurde ein löslicher IL-4-spezifischer Rezeptor eingesetzt. Dieser bindet IL-4 und verhindert so dessen Interaktion mit Oberflächenrezeptoren auf Endothelzellen sowie die auf die Rezeptorbindung folgende intrazelluläre Signaltransduktion. Nach Vorinkubation der HUVEC-Kultur für 1 h mit dem löslichen IL-4-Rezeptor in den Konzentrationen

0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml folgte eine 24-stündige zusätzliche Exposition mit IL-4 (1 ng/ml).

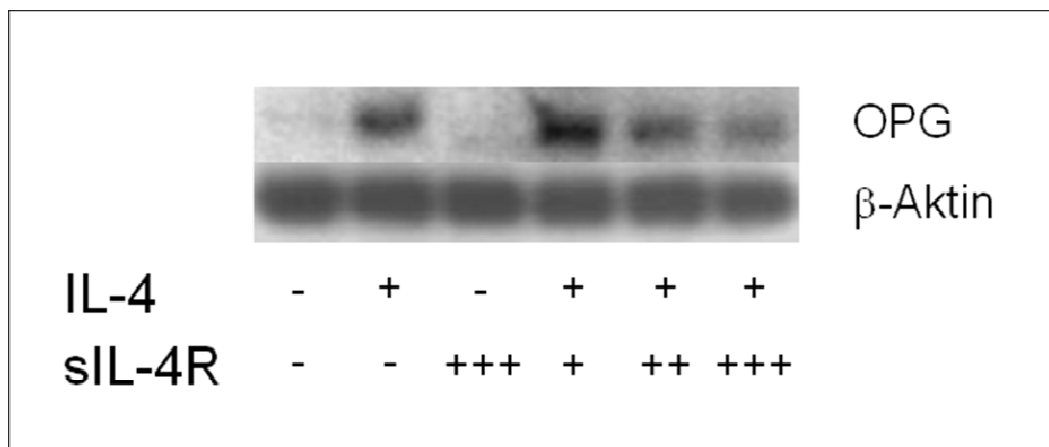


Abb. 11: Hemmung der IL-4-induzierten OPG-mRNA-Spiegel durch löslichen IL-4-Rezeptor. Die HUVEC wurden für 24 h mit 1 ng/ml ⁽⁺⁾IL-4 und löslichem IL-4-Rezeptor (sIL-4r) in den Konzentrationen 0,01 mg/ml (+), 0,1 mg/ml (+) und 1 mg/ml (+++) inkubiert. Der lösliche IL-4-Rezeptor wurde 1 h mit den Zellen vorinkubiert. Die Northern Blot-Analyse zeigt die gesteigerte Expression von OPG-mRNA (2,9 kb) unter IL-4-Stimulation und die dosisabhängige Aufhebung dieses Effektes durch Bindung des IL-4 an seinen löslichen Rezeptor, sowie zur Kontrolle die Expression der β-Aktin-mRNA (2,0 kb).

Die Exposition der HUVEC mit IL-4 (1 ng/ml) über 24 h resultiert in einer deutlichen Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel im Vergleich mit der nicht-stimulierten Kontroll-Kultur. Unter alleiniger Exposition der HUVEC mit löslichem IL-4-Rezeptor (1 µg/ml) zeigt sich keine Beeinflussung der OPG mRNA-Spiegel. Die Vorinkubation der HUVEC über 1 h mit dem löslichen IL-4-Rezeptor führt zu einer dosisabhängigen Aufhebung des durch IL-4 induzierten Effektes. Bei Applikation einer Rezeptor-Konzentration von 0,01 µg/ml zeigt sich im Vergleich mit den nicht-vorbehandelten IL-4-stimulierten Zellen noch kein Unterschied in den OPG-mRNA-Spiegeln. Bei einer Rezeptor-Konzentration von 0,1 µg/ml wird eine erkennbare Verringerung der OPG-mRNA-Spiegel erzielt. Der inhibierende Effekt wird durch eine weitere Steigerung der Rezeptor-Konzentration auf 1 µg/ml verstärkt. (Abb. 11).

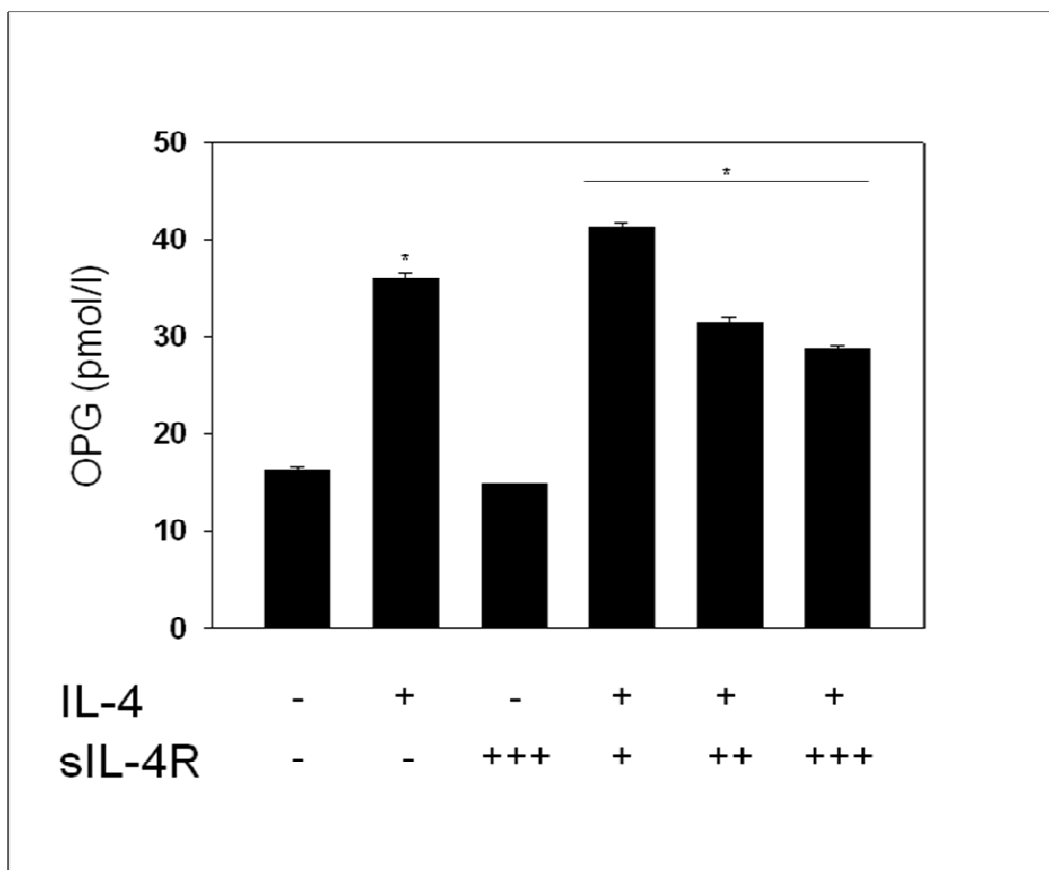


Abb. 12: Hemmung der IL-4-induzierten OPG-Protein-Sekretion durch den löslichen IL-4-spezifischen Rezeptor. Die HUVEC wurden zunächst für 1 h mit löslichem IL-4-Rezeptor in den Konzentrationen 0,01 µg/ml (+), 0,1 µg/ml (++) und 1 µg/ml (+++), dann für weitere 24 h mit zusätzlich 1 ng/ml (+) IL-4 inkubiert. Die Analyse per ELISA zeigt die gesteigerte Sekretion von OPG-Protein unter IL-4-Stimulation und die dosisabhängige Aufhebung dieses Effektes durch Bindung des IL-4 an seinen löslichen Rezeptor. Die Werte sind als MW ± SD aus 3-fach-Bestimmung dargestellt (*p < 0,01 im t-Test IL-4 vs. Kontrolle und mit ANOVA IL-4 + sIL-4R DWK).

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse können auf Protein-Ebene bestätigt werden. Die Analyse per ELISA zeigt die gesteigerte Sekretion von OPG-Protein unter IL-4-Stimulation und die dosisabhängige Aufhebung dieses Effektes durch Bindung des IL-4 an seinen löslichen Rezeptor. Zum Ausgleich der Variation der Zellzahlen wurden die dargestellten Messwerte des OPG-Proteins im Überstand der HUVEC-Kulturen anhand der photometrisch quantifizierten mRNA der Kontrolle korrigiert. Eine IL-4-Exposition (1 ng/ml IL-4 über 24 h) der HUVEC steigert die basale OPG-Protein-Sekretion um das 2-fache (*p < 0,01 im t-Test).

Der lösliche IL-4-Rezeptor blockiert dosisabhängig den IL-4 induzierten Effekt (**p < 0,01 mit ANOVA) (Abb. 12).

Die Identifikation des an der IL-4 stimulierten Phosphorylierung von STAT6 zu P-STAT6 beteiligten Rezeptors erfolgte ebenfalls durch den löslichen IL-4-Rezeptors. Sowohl unter basalen Kulturbedingungen als auch bei der Behandlung der HUVEC mit löslichem IL-4-Rezeptor allein wird kein STAT6 phosphoryliert. Dagegen induziert die Exposition der HUVEC mit IL-4 allein (1 ng/ml für 30 min) eine deutliche Phosphorylierung von STAT6. Eine Inkubation der HUVEC mit dem löslichem IL-4-Rezeptor (sIL-4R) in den Dosierungen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml 1 h vor Exposition der Zellen mit zusätzlich IL-4 (1 ng/ml) für weitere 30 min vermindert in Abhängigkeit von der Dosis des sIL-4R das Ausmaß der IL-4-induzierten Phosphorylierung von STAT6. Bei einer Dosis von 1 µg/ml sIL-4R verhindert dieser Rezeptor die IL-4-abhängige STAT6-Phosphorylierung nahezu vollständig (Abb. 13).

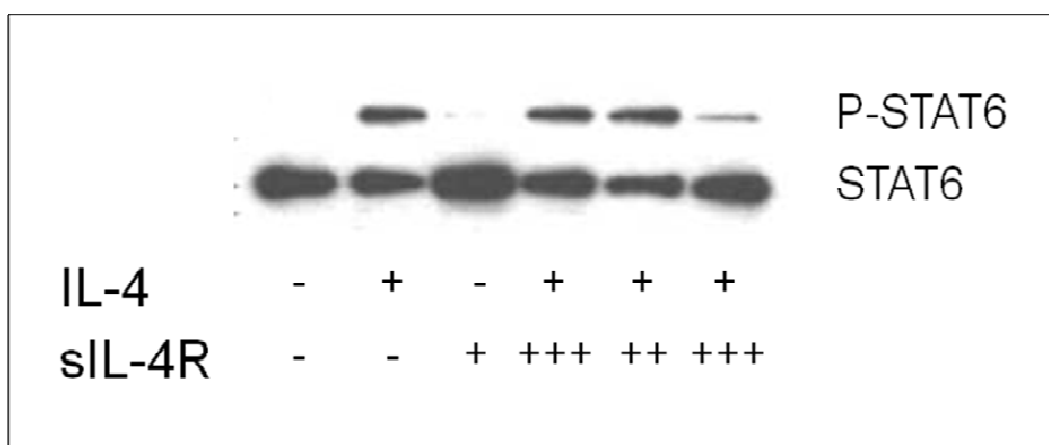


Abb. 13: Hemmung der IL-4-induzierten STAT6-Phosphorylierung durch den löslichen IL-4-spezifischen Rezeptor. Auf die 1 h Inkubation der HUVEC mit löslichem IL-4-Rezeptor (sIL-4R) in den Konzentrationen 0,01 µg/ml (+), 0,1 µg/ml (++) und 1 µg/ml (+++) folgten weitere 30 min Exposition mit 1 ng/ml IL-4 (+). Die Western Blot-Analyse zeigt die STAT6-Phosphorylierung unter IL-4-Exposition sowie die dosisabhängige Aufhebung dieses Effektes durch Bindung des IL-4 an seinen löslichen Rezeptor.

4.1.3. Hemmung der Signaltransduktion von Interleukin 4 durch spezifische Phospholipase C-Blockade

Im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion kann der Phosphatidylcholin-spezifische Inhibitor der Phospholipase C (PLC-I) D-609 die Aktivierung von STAT6 durch Hemmung der Phosphorylierung zu P-STAT6 hemmen (Zamorano et al., 2003). Der Phosphatidylcholin-spezifischer Inhibitor der Phospholipase D (PLD-I) G-418 hemmt diesen Schritt dagegen nicht. Daher wurden hier D-609 und G-418 zur Charakterisierung der STAT6-Phosphorylierung und Induktion der OPG-Genexpression unter IL-4-Exposition eingesetzt.

Auf 1 h Vorinkubation der HUVEC-Kulturen mit den Inhibitoren D-609 bzw. G-418 (jeweils 100 µg/ml) folgte die Exposition mit IL-4 (1 ng/ml) für 30 min.

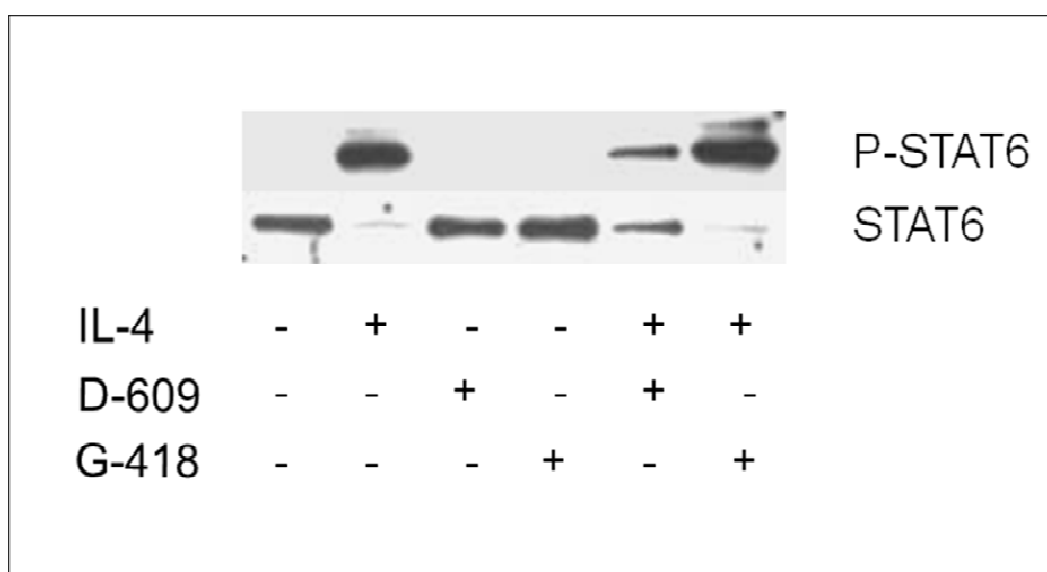


Abb. 14: IL-4-induzierte STAT6-Phosphorylierung durch die Phospholipase C. Nach Vorinkubation der HUVEC für 1 h mit 100 µg/ml PLC-Inhibitor D-609 bzw. 100 µg/ml PLD-Inhibitor G-418 folgten weitere 30 min Exposition mit 1 ng/ml IL-4. Die Western Blot-Analyse zeigt die Hemmung der IL-4-induzierten Phosphorylierung von STAT6 durch den PLC-Inhibitor D-609 und die fehlende Hemmung durch den PLD-Inhibitor G-418.

Die Western Blot-Analyse ergibt, dass eine Behandlung der HUVEC mit D-609 oder G-418 zu keiner STAT6-Phosphorylierung führt, während dagegen die Applikation von IL-4 allein eine deutliche Phosphorylierung des STAT6 zu P-STAT6 induziert. Die IL-4-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors

wird durch Vorbehandlung der HUVEC mit G-418 nicht beeinflusst. Die Vorbehandlung der Endothelzellen mit D-609 verhindert dagegen die Induktion der STAT6-Phosphorylierung durch anschließend zugegebenes IL-4 (Abb. 14).

Der hemmende Effekt des PLC-Inhibitors D-609 auf die OPG-Regulation durch IL-4 lässt sich ebenfalls auf Proteinebene durch Analyse des Kultur-Überstandes von HUVEC-Zellen bestätigen.

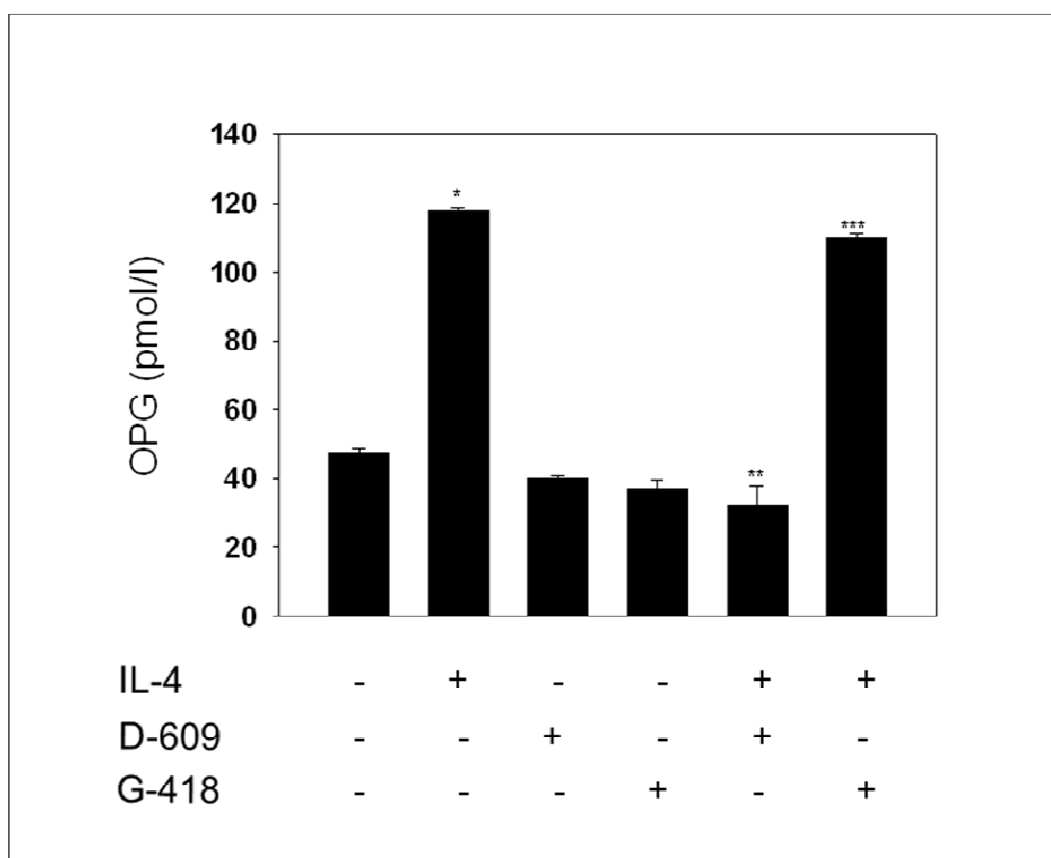


Abb. 15: PLC als Komponente der IL-4-induzierten Steigerung der OPG-Protein-Sekretion.

Auf die 1 h Vorinkubation der HUVEC mit 1 µg/ml PLC-Inhibitor D-609 bzw. 250 ng/ml PLD-Inhibitor G-418 folgten weitere 24 h Exposition mit 1 ng/ml IL-4. Die Analyse per ELISA zeigt die gesteigerte Sekretion von OPG-Protein unter IL-4-Stimulation und der Aufhebung dieses Effektes durch den PLC-Inhibitor D-609 bzw. der fehlenden Aufhebung durch den PLD-Inhibitor G-418. Die Werte sind als MW ± SD aus 3-fach-Bestimmung dargestellt (*p < 0,00001 im t-Test IL-4 vs. Kontrolle; **p < 0,0001 im t-Test IL-4 + D609 vs. IL-4; ***p > 0,05 im t-Test IL-4 + G418 vs. IL-4).

Eine Inkubation der HUVEC mit IL-4 (1 ng/ml) für 24 h steigert die Konzentration an sezernierten OPG-Protein im Überstand um das 2,5 fache im Vergleich zur HUVEC-Kultur unter basalen Bedingungen (* $p < 0,00001$ im t Test). Die Vorinkubation der HUVEC mit PLD-Inhibitor G-418 (250 ng/ml) beeinflusst die IL-4-Wirkung nicht (** $p > 0,05$ im t-Test). Die Vorbehandlung der HUVEC mit PLC-Inhibitor D-609 (250 ng/ml) hemmt hingegen die IL-4-induzierte Steigerung der OPG-Protein-Sekretion, wobei die Konzentration an OPG-Protein im Kultur-Überstand im Vergleich zu IL-4-stimulierten HUVEC ohne Inhibitor-Vorbehandlung signifikant reduziert ist (** $p < 0,0001$ im t-Test). Die dargestellten Messwerte des OPG-Proteins im Überstand der HUVEC-Kulturen wurden anhand der photometrisch quantifizierten mRNA der Kontrolle korrigiert, so dass von einer äquivalenten Zellzahl ausgegangen werden kann (Abb. 15).

HUVEC-Zellkulturen zeigen eine ausgeprägte Spender-Variabilität bezüglich der basalen OPG-mRNA-Spiegel und OPG-Proteinsekretion. Diese variiert von nicht-messbar bis 6 pmol/l OPG-Protein im Kultur-Überstand. Ebenso zeigen sich deutliche Differenzen der Reaktivität der HUVEC auf Stimulanzen und Inhibitoren.

4.2. Osteoklasten-Assay: *In vitro* Modell zur Quantifizierung der Knochenresorption

In dem hier verwendeten Osteoklasten-Assay differenzieren monozytäre Vorläuferzellen in einem speziellen Differenzierungsmedium unter dem Zusatz hinreichender Konzentrationen von M-CSF (33 ng/ml) und RANKL (66 ng/ml) zu funktionsfähigen Osteoklasten, die Knochen resorbieren können. Die Fluoreszenz der von ihnen aus der Beschichtung der Assay-Kulturplatte in das Kulturmedium freigesetzten Europium-gekoppelten Kollagen-Fragmente wurde nach qualitativer Beurteilung der Zellkultur im Osteoklasten-Assay nach 11-12 Tagen Kultur

fluorimetrisch bestimmt und zur quantitativen Analyse der Resorptionsaktivität der Zellen im Osteoklasten-Assay herangezogen.

Die gemessene Fluoreszenz des Kulturüberstandes ist der Anzahl reifer Osteoklasten und ihrer Resorptionsaktivität direkt proportional und kann daher zur quantitativen Beurteilung der Osteoklastendifferenzierung verwendet werden.

Die Ergebnisse sind als arbiträre fluoreszierende Einheiten im Vergleich der freigesetzten Menge einer jeweiligen Kontroll-Kultur (100 %). Eine Hemmung der Genese und der Funktion der Osteoklasten präsentiert sich somit als prozentuale Verminderung des Ausgangswertes.

4.2.1. Direkte Wirkung der T_H2-Zytokine auf die Osteoklastogenese

Zunächst wurde die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten im *in vitro* Osteoklasten-Assay anhand ihrer Resorptionsaktivität unter optimalen Wachstums- und Differenzierungsbedingungen validiert und dann die Modulation dieser Prozesse durch Osteoklasten-Inhibitoren analysiert. Dies diente als Basis für die nachfolgenden Untersuchungen der bisher unbekannten Effekte von Endothelzellen auf Osteoklastogenese und Resorptionsaktivität reifer Osteoklasten.

Eine vollständige Osteoklastogenese und Aktivierung reifer Osteoklasten ist *in vitro* allein von der M-CSF-Konzentration und der RANKL-Konzentration im Medium abhängig und bedarf keines Zell-Zell-Kontaktes mit anderen Zellen des Knochengewebes (Teitelbaum, 2000). Die Bedeutung von RANKL für die Ausdifferenzierung osteoklastärer Vorläuferzellen zu aktiven Osteoklasten konnte in einem *in vitro*-Modell der Osteoklastogenese verifiziert werden. Im Vergleich zu Positiv-Kontroll-Kulturen mit optimaler RANKL-Konzentration im Kulturmedium (66 ng/ml RANKL) wurde bei weiteren osteoklastären Vorläuferzellkulturen die RANKL-Konzentrationen im Kulturmedium verringert (33 ng/ml bzw. 6,6 ng/ml RANKL) sowie Osteoklastenvorläuferzellen in RANKL-freiem Kulturmedium kultiviert. Die Rahmenbedingungen und die

weitere Zusammensetzung des Kulturmediums wurden konstant gehalten. Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der Menge freigesetzter Kollagen-Fragmente in Abhängigkeit von der RANKL-Konzentration im Kulturmedium (* $p < 0,0001$ mit ANOVA). Zellkulturen mit RANKL-freiem Kulturmedium zeigten im Vergleich zu optimal mit RANKL versorgten Kulturen (66 ng/ml RANKL im Kulturmedium) eine um $87,1 \pm 0,9 \%$ geringere Fluoreszenz, was eine entsprechend verminderte Osteoklasten-Differenzierung und Aktivierung bedeutet ($p < 0,001$ im t-Test) (Abb. 16).

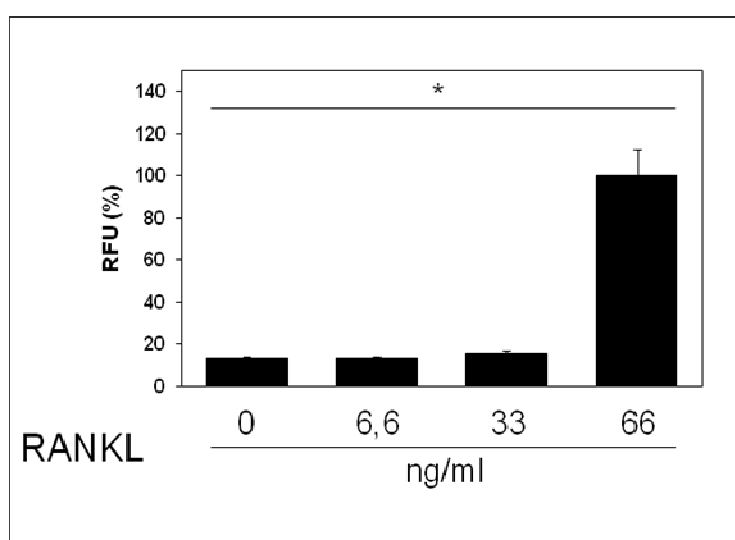


Abb. 16: Osteoklastendifferenzierung in Abhängigkeit von RANKL. Die RANKL-Konzentrationen im Kulturmedium der osteoklastären Vorläuferzellen betrugen 0, 6,6, 33 und 66 ng/ml (Kontrolle). Die Osteoklastenaktivität (RFU) der Kulturen mit 66 ng/ml RANKL im Kulturmedium wurde als 100 % definiert. Die Werte sind als MW \pm SD in % bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus 3-fach-Bestimmung angegeben (* $p < 0,0001$ bei ANOVA der RANKL-Dosiswirkungskurve).

Die weitere Evaluierung der Osteoklastogenese mit diesem *in vitro*-Assay erfolgte durch Analyse der Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen zu reifen, funktionsfähigen Osteoklasten unter direktem Einfluss von IL-4 und IL-13. Die Kultur der erfolgte in Osteoklasten-Differenzierungsmedium mit Zusatz von M-CSF (33 ng/ml) und RANKL (66 ng/ml). Die T_H2 -Zytokine wurden jeweils direkt in einer Dosierung von 10 ng/ml IL-4 bzw. IL-13 zu Beginn der Kultur und bei Mediumwechsel am 7. Tag zugegeben.

Im Vergleich zu Kontroll-Kulturen (RANKL 66 ng/ml ohne IL-Zusatz) zeigt sich eine signifikante Reduktion der freigesetzten Menge an Kollagen-Fragmenten bei den Zellkulturen, die mit 10 ng/ml IL-4 (* $p < 0,001$ im t-Test), bzw. 10 ng/ml IL-13 (* $p < 0,001$ im t-Test) behandelt wurden. IL-4 und IL-13 vermindern jeweils die Menge freigesetzter Kollagen-Fragmente um $87,4 \pm 1,0$ % bzw. $87,4 \pm 1,7$ % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 17).

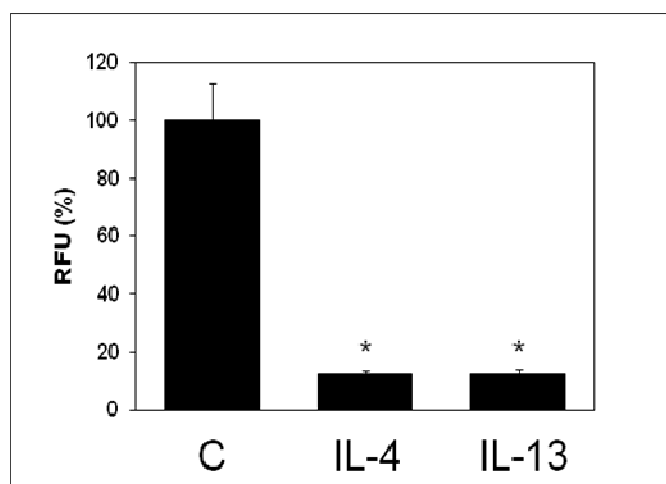


Abb. 17: Direkte Effekte von IL-4 und IL-13 auf die Osteoklastenaktivität. Osteoklastäre Vorläuferzellen wurden in Differenzierungsmedium (RANKL 66 ng/ml) ohne Interleukin-Zusatz als Kontrolle sowie mit jeweilig direkt zugegebenen 10 ng/ml IL-4 bzw. IL-13 bei Ansatz der Kultur und Erneuerung des Mediums am 7. Tag der Kultur. Die Werte sind als MW \pm SD in % bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus 3-fach-Bestimmung angegeben (* $p < 0,001$ im t-Test, IL-4 bzw. IL-13 vs. Kontrolle C).

Zusammenfassend kann die Abhängigkeit der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität in diesem *in vitro* Assay von RANKL sowie die bereits von anderen Gruppen (Mangashetti et al., 2005; Palmqvist et al., 2006; Moreno et al., 2003) während der Anfertigung dieser Arbeit publizierten Daten zur direkten Hemmung der osteoklastären Knochenresorption durch IL-4 und IL-13 bestätigen.

4.2.2. Parakrine Modulation der Osteoklastogenese durch Endothelzellen

Indirekte Effekte von IL-4 und IL-13 auf die Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität

Laut Literaturangaben sollen IL-4 und IL-13 neben der direkten Hemmung der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität diese auch indirekt unterdrücken, indem sie andere Zellen in der Umgebung von Osteoklasten und deren Vorläufern zur Produktion Osteoklasten-modulierender Faktoren, einschließlich der Komponenten des RANKL/RANK/OPG-Systems stimulieren (Palmqvist et al., 2006). Wie unter 4.1. dargestellt, modulieren IL-4 und IL-13 das Expressionsprofil von OPG in humanen Endothelzellen. Das Vorkommen der Osteoklasten und ihren Vorläufern in Gefäßwänden im Rahmen der heterotopen Ossifikationen, die Beteiligung von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese in der Knochenneubildung, sowie die kritische Rolle der endothelialen Dysfunktion unter Kalzifizierung-fördernden Bedingungen machten IL-4 und IL-13 als Modulatoren der basalen Endothelfunktion zu möglichen Kandidaten in der Analyse der Interaktion von Endothel und Osteoklasten bzw. ihren Vorläufern.

HUVEC-Kulturen wurden mit IL-4 bzw. IL-13 entsprechend 4.1. in den Dosierungen 0, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml für 24 h exponiert und die Überstände anschließend für den weiteren Einsatz im Osteoklasten-Assay aufbewahrt. Die Kultur der osteoklastären Vorläuferzellen im Osteoklasten-Assay erfolgte in einem Medium, das sich zu 50 % aus OC-Differenzierungsmedium und zu 50% aus dem gewonnenen Überstand der HUVEC-Kulturen zusammensetzte. M-CSF und RANKL wurden so dosiert, dass nach dem Verdünnen die Endkonzentrationen von 33 ng/ml bzw. 66 ng/ml gegeben waren. Am 7. Tag der Kultur wurde das Medium entsprechend dem Ansatz erneuert. Die Quantifizierung anhand der Fluoreszenzmessung des Assay-Kulturüberstandes erfolgte am 11. Tag der Kultur.

Die Kultivierung der Osteoklastenvorläufer-Zellen in Medium bestehend zu 50 % aus Überstand der IL-4-stimulierten HUVEC zeigt eine signifikante, von der IL-4-Dosis abhängige Abnahme der Menge resorptiv freigesetzten Kollagen-Fragmente

(* $p < 0,0001$; ANOVA). Verglichen mit dem Überstand der unter basalen Bedingungen kultivierten HUVEC reduziert der Überstand der mit 1 ng/ml IL-4 stimulierten HUVEC die Resorptionsaktivität der Zellen im Osteoklasten-Assay bereits um $83,7 \pm 2,0 \%$ ($p < 0,001$ im t-Test), Überstand von 10 ng/ml-IL-4 stimulierten HUVEC reduziert die Menge freigesetzter Kollagen-Fragmente um $90,2 \pm 0,5 \%$ ($p < 0,001$ im t-Test) (Abb. 18).

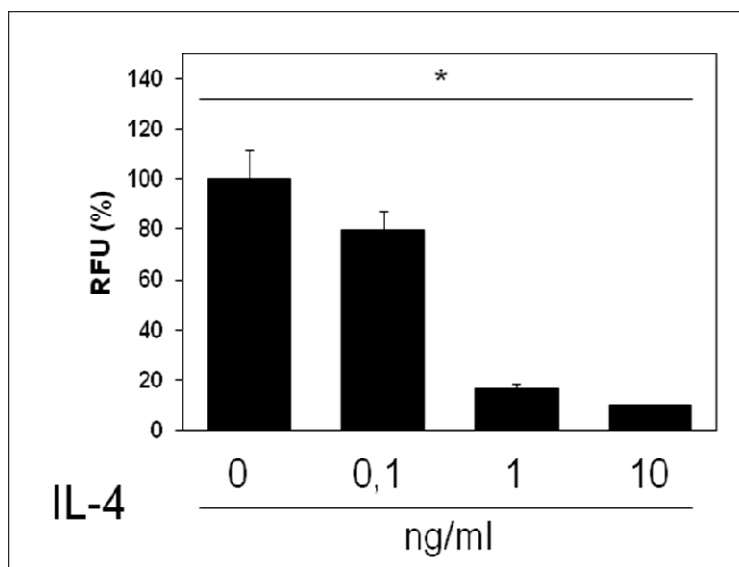


Abb. 18: Indirekte Hemmung der Osteoklastenaktivität durch IL-4. Osteoklastäre Vorläuferzellen wurden in einem Medium bestehend aus 50 % Differenzierungsmedium und aus 50 % Überstand der HUVEC-Kultur mit einer Endkonzentration RANKL von 66 ng/ml und M-CSF 33 ng/ml kultiviert. Die Stimulation der HUVEC erfolgte zuvor mit IL-4 in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml über 24 h. Die Werte sind als MW \pm SD in % bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus 3-fach-Bestimmung angegeben (* $p < 0,0001$ mit ANOVA, verschiedene Dosierungen von IL-4).

Die Zugabe von löslichem IL-4-Rezeptor (sIL-4R) zu Kulturüberstand IL-4-exponierter HUVEC hatte keinen signifikanten Effekt auf die Osteoklastenaktivität (Kontrolle: $100 \pm 8,8 \%$, IL-4, 10 ng/ml: $28 \pm 2,8 \%$, IL-4, 10 ng/ml/sIL-4R, 10 ng/ml: $22 \pm 4,2 \%$, IL-4, 10 ng/ml/sIL-4R, 100 ng/ml: $25 \pm 2,1 \%$, IL-4, 10 ng/ml/sIL-4R, 1000 ng/ml: $29 \pm 5,9 \%$). Dies zeigt, dass der hemmende Effekt nicht auf einem Transfer biologisch aktiven IL-4 aus dem HUVEC-Kulturüberstand in den Osteoklasten-Assay beruht.

Die Kulturen des Osteoklasten-Assays in Medium bestehend zu 50 % aus Überstand mit IL-13 stimulierten HUVEC setzen ebenfalls eine in Abhängigkeit von der IL-13-Dosis signifikante verringerte Menge an Kollagen-Fragmenten frei (* $p < 0,001$ bei ANOVA). Der Kulturüberstand von HUVEC, die mit IL-13 in der Dosierung 1 ng/ml stimuliert wurden, reduziert die Resorptionsaktivität der Zellen im Osteoklasten-Assay im Vergleich zu basalem HUVEC-Kulturüberstand um $61,6 \pm 4,0$ % ($p < 0,05$ im t-Test). Bei Kultivierung der OCP in Medium mit 50 % Kulturüberstand von 10 ng/ml-IL-13-stimulierten HUVEC ist die Menge freigesetzter Kollagen-Fragmente um $85,1 \pm 1,9$ % verringert ($p < 0,01$ im t-Test) (Abb. 19).

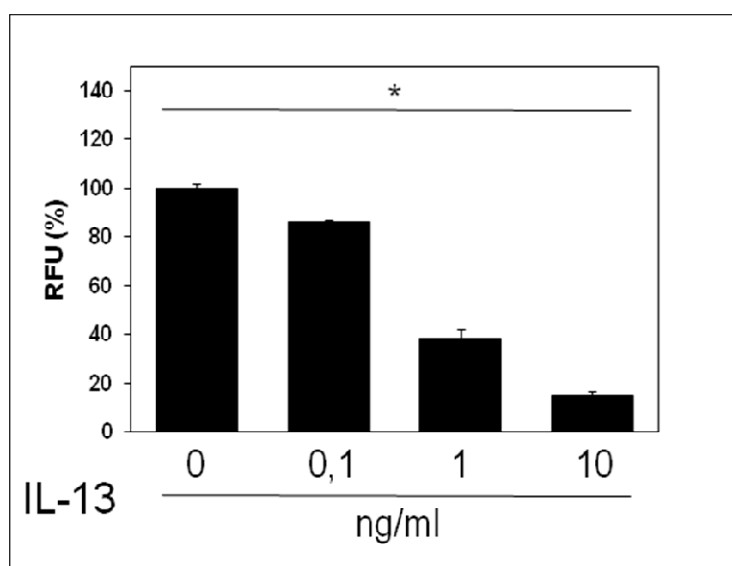


Abb. 19: Indirekte Hemmung der Osteoklastenaktivität durch IL-13. Osteoklastäre Vorläuferzellen wurden in einem Medium bestehend aus 50 % Differenzierungsmedium und 50 % Überstand der HUVEC-Kultur mit einer Endkonzentration RANKL von 66 ng/ml und M-CSF 33 ng/ml kultiviert. Die Stimulation der HUVEC erfolgte zuvor mit IL-13 in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml über 24 h. Die Werte sind als MW \pm SD in % bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus 3-fach-Bestimmung angegeben (* $p < 0,01$ mit ANOVA, verschiedene Dosierungen von IL-13).

Die Zusammensetzung des Osteoklasten-Differenzierungsmediums sowie das Verhältnis von Differenzierungsmedium zu HUVEC-Kulturüberstand wurden konstant gehalten. Die Unterschiede der Resorptionsaktivität der Kulturen im Osteoklasten-Assay innerhalb eines Versuchsansatzes können somit auf

Unterschiede der von den HUVEC in ihren Kulturüberstand sezernierten Faktoren zurückgeführt werden.

Parakrine Hemmung der Osteoklastogenese durch endotheliales Osteoprotegerin

IL-4 und IL-13 steigern dosisabhängig die basale OPG-Expression der HUVEC (Abb. 5). Zusammen mit den Beobachtungen im Osteoklasten-Assay (Abb. 18 und Abb. 19) deutete dies auf OPG als potentiellen Mediator der durch HUVEC induzierten Hemmung der Osteoklastogenese und der Resorptionsaktivität im Osteoklasten-Assay hin. Zur Analyse, ob dieser Effekt tatsächlich auf von HUVEC sezerniertes OPG zurückzuführen ist, wurde ein neutralisierender humaner OPG-Antikörper mit einer Neutralisierungsdosis ND_{50} von 0,25 - 0,7 $\mu\text{g/ml}$ für 0,1 $\mu\text{g/ml}$ lösliches OPG eingesetzt. Die Osteoklasten-Vorläuferzellen wurden in einem Medium kultiviert, das sich zu 50 % aus OC Differenzierungsmedium und zu 50 % aus Kulturüberstand unstimulierter HUVEC-Kulturen mit einer basalen OPG-Konzentration von 0,559 pmol/l (entsprechend 11,18 pg/ml) bestand. Die Endkonzentration von RANKL und M-CSF betrugen in diesen Kulturmedien 66 ng/ml bzw. 33 ng/ml . Als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle dienten Kulturen in reinem OC-Differenzierungsmedium mit RANKL 100 % (66 ng/ml) bzw. RANKL 0 % (* $p < 0,0005$ im t-Test). Der neutralisierende OPG-Antikörper wurde in den Dosierungen 2 ng/ml , 20 ng/ml und 200 ng/ml (1- bis 100-fache ND_{50}) eingesetzt. Als Kontrollantikörper wurde ein IgG-Antikörper ohne OPG-Affinität in gleicher Konzentration wie der OPG-Antikörper verwendet.

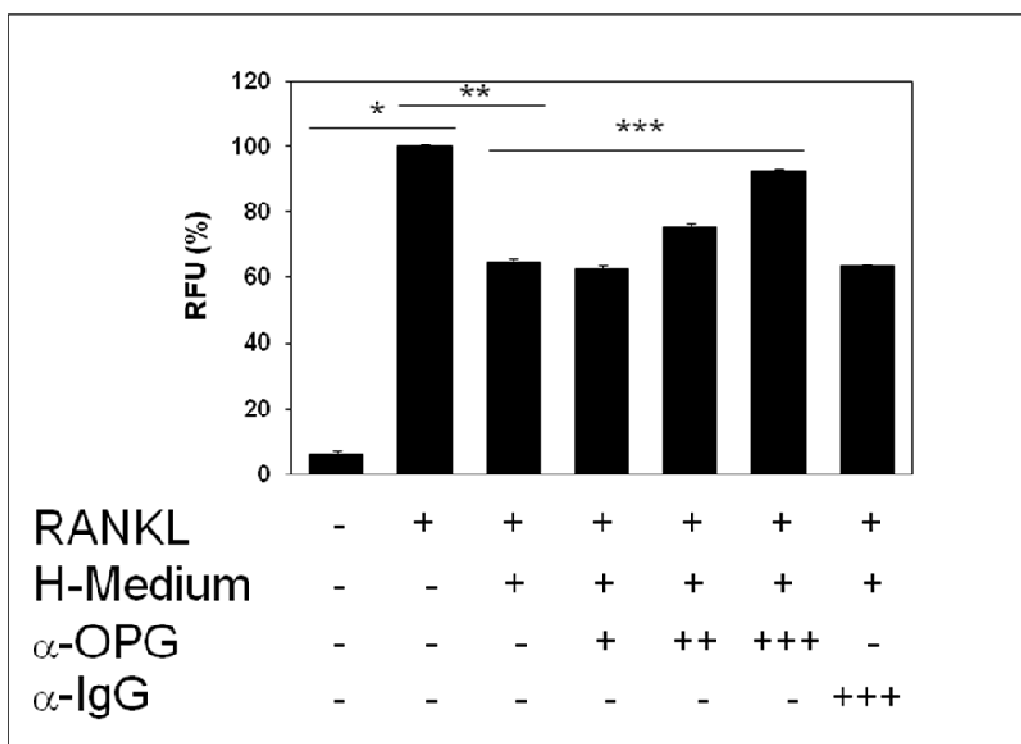


Abb. 20: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch endotheliales OPG und Aufhebung dieses Effektes durch einen neutralisierenden OPG-Antikörper. Osteoklastäre Vorläuferzellen wurden in einem Medium bestehend zu gleichen Teilen aus Differenzierungsmedium und HUVEC-Kulturüberstand (H-Medium) kultiviert, die Endkonzentrationen von RANKL und M-CSF betrugen in diesen Kulturen 66 ng/ml bzw. 33 ng/ml. Die Konzentration des OPG-Antikörpers (α-OPG) betrug 2 ng/ml⁽⁺⁾, 20 ng/ml⁽⁺⁺⁾ und 200 ng/ml⁽⁺⁺⁺⁾. Als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle dienten Kulturen in reinem Differenzierungsmedium mit RANKL 100 % (66 ng/ml) bzw. RANKL 0 %. Als Kontrollantikörper wurde ein IgG-Antikörper ohne OPG-Affinität in gleicher Konzentration wie der OPG-Antikörper eingesetzt. Die Werte sind als MW ± SD in % bezogen auf die Positiv-Kontrolle (100 %) aus 4-fach-Bestimmungen angegeben (*p < 0,0005 im t-Test, Osteoklastendifferenzierung bei 100 % RANKL vs. 0 % RANKL im Medium; **p < 0,005 im t-Test, Osteoklastendifferenzierung bei Zusatz HUVEC-Medium vs. ohne Zusatz; ***p < 0,00005 mit ANOVA, Osteoklastendifferenzierung bei verschiedenen Dosierungen des eingesetzten α-OPG).

Es zeigt sich bei Zusatz von HUVEC-Kulturüberstand zum Differenzierungsmedium eine signifikante Reduktion der Resorptionsaktivität im Osteoklasten-Assay um $35,0 \pm 2,8$ % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle (**p < 0,005 im t-Test). Dieser hemmende Effekt des Endothelzellmediums kann durch den neutralisierenden OPG-Antikörper (α-OPG) dosisabhängig aufgehoben werden (***p < 0,00005 mit ANOVA). Während es bei einer α-OPG-

Konzentration von 2 ng/ml (10-fache ND_{50}) bereits zu einer signifikanten Abschwächung des endothelialen Effektes auf die Osteoklastogenese kommt ($p < 0,05$ im t-Test), wird dieser durch eine Steigerung der α -OPG-Konzentration auf 20 ng/ml (100-fache ND_{50}) komplett aufgehoben ($p < 0,0005$ im t-Test). Gemessen an der Menge resorptiv freigesetzter Kollagenfragmente erfolgt bei diesen Zellkulturen eine Ausdifferenzierung und Aktivierung der osteoklastären Zellen, die den Kulturen der Positiv-Kontrolle entspricht ($p = 0,23$ im t-Test). Die Zugabe von 20 ng/ml des IgG-Kontroll-Antikörpers führt zu keiner Minderung des endothelialen Effektes ($p = 0,60$ im t-Test), so dass der hemmende Effekt spezifisch auf OPG im Kulturüberstand beruht (Abb.20).

Zur Analyse indirekter IL-4-Effekte via Endothelzellstimulation auf die Osteoklastogenese wurde in einem ähnlichen Versuchsansatz IL-4-exponierter HUVEC-Kulturüberstand eingesetzt. Die Endothelzellen waren zuvor mit 10 ng/ml IL-4 über 24 h stimuliert worden. Die OPG-Konzentration der eingesetzten HUVEC-Kulturüberstände betrug 8,9 pmol/l (= 178 pg/ml). Der OPG-Antikörper wurde in den Konzentrationen 2 ng/ml, 20 ng/ml und 200 ng/ml (5-500 fache ND_{50}) eingesetzt.

Durch Zusatz von Kulturüberstand IL-4-exponierter HUVEC reduziert sich die osteoklastäre Resorptionsaktivität um $79 \pm 1,9 \%$ ($*p < 0,01$ im t-Test) verglichen mit der Positiv-Kontrolle. Dieser hemmende Effekt kann durch α -OPG dosisabhängig und signifikant abgeschwächt werden ($**p < 0,05$ mit ANOVA). In einer Konzentration von 20 ng/ml steigert die Zugabe von α -OPG die Resorptionsaktivität um 67 % verglichen mit den Kulturen in IL-exponiertem Kulturmedium ohne Antikörperzusatz. Die gemessenen Fluoreszenzeinheiten der resorptiv freigesetzten Kollagenfragmente sind jedoch mit $31,5 \pm 2,1 \%$ (2 ng/ml α -OPG) bzw. $36,7 \pm 5,0 \%$ (20 ng/ml α -OPG) gegenüber der Kontroll-Kultur noch signifikant vermindert ($p < 0,05$; t-Test). Der hemmende Effekt des IL-4-exponierten Endothelzellmediums kann auch durch eine Steigerung der α -OPG-Konzentration auf 200 ng/ml nicht vollständig aufgehoben werden (Abb. 21).

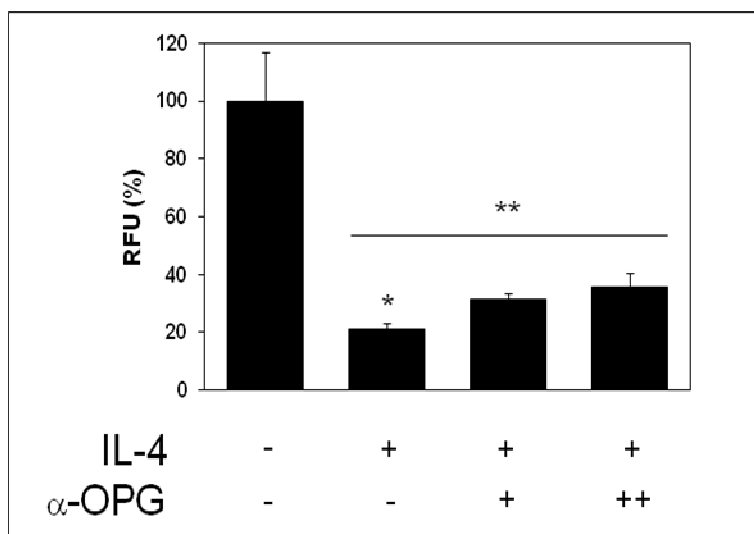


Abb. 21: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch HUVEC unter IL-4-Exposition und Minderung dieses Effektes durch einen neutralisierenden OPG-Antikörper. Osteoklastäre Vorläuferzellen wurden in einem Medium bestehend zu gleichen Teilen aus Differenzierungsmedium und IL-4 (10 ng/ml) exponiertem HUVEC-Kulturüberstand (IL-4) kultiviert. Die Endkonzentrationen von RANKL und M-CSF betrugen in diesen Kulturen 66 ng/ml bzw. 33 ng/ml. Die Konzentration des OPG-Antikörpers (α -OPG) betrug 2 ng/ml⁽⁺⁾ und 20 ng/ml⁽⁺⁺⁾. Als Kontrolle dienten Kulturen in reinem Differenzierungsmedium. Die Werte sind als MW \pm SD in % bezogen auf die Kontrolle (100 %) aus 3-fach-Bestimmung angegeben (*p < 0,01 im t-Test, Osteoklastendifferenzierung bei Zusatz IL-4-exponiertem HUVEC-Überstand⁺ vs. Kontrolle; **p < 0,05 mit ANOVA, Osteoklastendifferenzierung bei verschiedenen Dosierungen des eingesetzten α -OPG).

5. Diskussion

T_H2-Zytokine in der Interaktion von Endothelzellen mit Osteoklasten

Die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 sind an der Pathogenese verschiedener inflammatorischer Erkrankungen beteiligt, die mit pathophysiologischen Knochenumbauvorgängen assoziiert sind. So wurden die Effekte des IL-4 auf das zentrale Regulationssystem des Knochenstoffwechsels, das RANKL/RANK/OPG-System, u.a. an Modellen entzündlicher Arthritiden untersucht. Es zeigte sich, dass IL-4 die Expression der Komponenten des RANKL/RANK/OPG-Systems nicht nur in Zellen des Knochenstoffwechsels beeinflussen kann. So hemmte IL-4 beispielsweise die RANKL-Expression und steigerte die OPG-Sekretion in Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Lee et al., 2004c). In neutrophilen Granulozyten gesunder Menschen konnte durch IL-4 die Expression von OPG und RANK induziert werden, was dem Expressionsprofil neutrophiler Granulozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis entsprach (Poubelle et al., 2007). Die rheumatoide Arthritis ist mit einer erhöhten Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert (Wong et al., 2003; Chung et al., 2005), was vermutlich auf die chronische Entzündungsreaktion zurückzuführen ist, die auch die Gefäßwände miteinbeziehen kann (Warrington et al., 2005; Frostegard, 2005). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass neben den pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β auch die eigentlich als anti-inflammatorisch eingestuft Zytokine IL-4 und IL-13 an Entzündungsprozessen wie der Atherogenese beteiligt sind (Davenport et al., 2003; George et al., 2000; King et al., 2002), zumal atherosklerotische Läsionen vermehrt IL-4 aufweisen (Sasaguri et al., 1998). Es wird vermutet, dass eine Verknüpfung zwischen chronischen Entzündungsprozessen und pathologischen Umbauvorgängen der Knochen besteht, wie sie bei rheumatoider Arthritis und kalzifizierenden Läsionen der Atherosklerose vorkommen. Patienten mit rheumatoider Arthritis wiesen erhöhte OPG-Serumkonzentrationen auf, die mit Entzündungsparametern, wie der Erythrozyten-Sedimentationsgeschwindigkeit sowie mit der Krankheitsdauer der

rheumatoiden Arthritis und der koronaren Arterienverkalkung unabhängig von kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert waren (Asanuma et al., 2007).

5.1. Regulation der endothelialen OPG-Produktion durch Interleukin-4 und Interleukin-13

In der vaskulären Gefäßwand wird OPG unter dem Einfluss verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren, wie IL-1 β , TNF- α , PDGF, VEGF in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen (Collin-Osdoby, 2004; Hofbauer und Schoppet, 2004; Zhang et al., 2002; Min et al., 2003, Zannettino et al., 2005) sowie in CSMC bei kurzzeitiger Exposition mit den T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 (Hofbauer et al., 2006) vermehrt exprimiert. Ein besonderes Interesse gilt in dieser Arbeit der OPG-Produktion in Endothelzellen, da diese die vorderste Zellschicht zum Schutz einer intakten Gefäßwand repräsentieren. Die entzündungsbedingte Aktivierung und Dysfunktion des Endothels wird als entscheidend in der Atherogenese angesehen (Gimbrone et al., 2000; Toborek und Kaiser, 1999; Toborek et al. 2002). Eine chronische Entzündungsreaktion kann die Gefäßwand schädigen und pathogene Gewebeveränderungen wie bei der Atherosklerose bedingen (Toborek und Kaiser, 1999; Berliner et al., 1995). Das Gefäßendothel reguliert bei Entzündungsreaktionen primär die Produktion entzündlicher Mediatoren (Lee et al., 2004a; Ross, 1999). Die Rekrutierung und Adhäsion von Entzündungszellen, sowie deren Migration in die Gefäßwand wird vor allem durch eine gesteigerte Expression pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α), Chemokine (MCP-1) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) in Endothelzellen ermöglicht (Toborek et al., 2002).

OPG wird im humanen Endothel *in vivo* als auch in HUVEC *in vitro* basal produziert und liegt in einem Komplex mit dem von Willebrand-Faktor in den Weibel-Palade-Körperchen vor (Zannettino et al., 2005; Schoppet et al., 2002). Auf die Aktivierung der Endothelzellen durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β folgen die Mobilisation dieses Komplexes und die Sekretion von OPG (Zannettino et al., 2005). Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass auch die Stimulation der HUVEC mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 zu einer dosis-

und zeitabhängigen Steigerung der OPG-Produktion führt. Dieser Produktionszuwachs ist allerdings geringer, als unter Exposition der HUVEC mit TNF- α und IL-1 β , das sich als potentester Induktor von OPG erwies (Stein et al., 2008). Der IL-4-spezifische lösliche Rezeptor verhindert die Interaktion von IL-4 mit seinem membranständigen Rezeptor und blockiert die IL-4-induzierten Steigerung der OPG-mRNA-Spiegel und OPG-Sekretion der HUVEC. Die IL-4-induzierte OPG-Produktion in Endothelzellen ist somit von der direkten und spezifischen Interaktion von IL-4 und seinem Rezeptor auf der Endothelzelloberfläche abhängig.

IL-4-Rezeptoren setzen sich aus zwei Transmembranproteinen zusammen. Die IL-4R α -Kette bindet IL-4 mit hoher Affinität und löst dadurch die Dimerisierung mit einem zweiten Transmembranprotein aus, das entweder zur Bildung des Rezeptors Typ 1 oder 2 führt. Zellen der hämatopoietischen Zelllinie tragen Typ 1-Rezeptoren, die sich durch Dimerisierung der IL-4R α -Kette mit der γ -Kette, die ebenfalls Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, -7, -9, -15 und -21 ist, bilden (Chromarat et al., 1998; Nelms et al., 1999; Pernis et al., 2002). In nicht hämatopoietischen Zellen, wie auch Endothelzellen, wird dagegen der Typ 2-Rezeptor durch Interaktion der IL-4R α -Kette mit der IL-13R α 1-Kette anstelle der γ -Kette gebildet (Nelms et al., 1999; Pernis et al., 2002). IL-13 kann ebenfalls an zwei verschiedene Rezeptorkomplexe binden. Zum einen bindet es mit hoher Affinität an IL-13R α 1 in einem Rezeptorkomplex, der mit dem IL-4-Typ 2-Rezeptor identisch ist. Ferner bindet auch IL-13 an IL-13R α 2, wobei die Affinität höher ist, als die zu IL-13R α 1. Allerdings wird durch diese Rezeptorbindung keine nachfolgende Signalkaskade induziert (Kelly-Welch et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass die IL-4 und IL-13-induzierten Effekte in Endothelzellen über den IL-4R α /IL-13R α 1-Rezeptorkomplex ausgelöst werden (Palmer-Crocker et al., 1996).

Vergleichbar mit anderen Zytokinrezeptoren sind die zytoplasmatischen Anteile der IL-4 und IL-13-Rezeptoruntereinheiten mit Tyrosinkinasen der Janus-Familie (JAK 1-3, TYK 2) assoziiert (Chromarat et al., 1998; Nelms et al., 1999; Pernis et al., 2002; Keegan et al., 1995). IL-4R α assoziiert mit JAK1, die γ -Kette mit JAK3, IL-13R α 1 interagiert mit entweder JAK2 oder TYK2, aber nicht mit JAK3.

Eine Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten steigert die JAK-Aktivität und führt zur Phosphorylierung der Tyrosin-Enden in der zytoplasmatischen Domäne von IL-4R α . Die phosphorylierten Tyrosine wiederum agieren als Bindestelle für Signalmoleküle mit Protein-Tyrosin-Bindungsdomänen oder SH2 (Src Homologe Domäne 2).

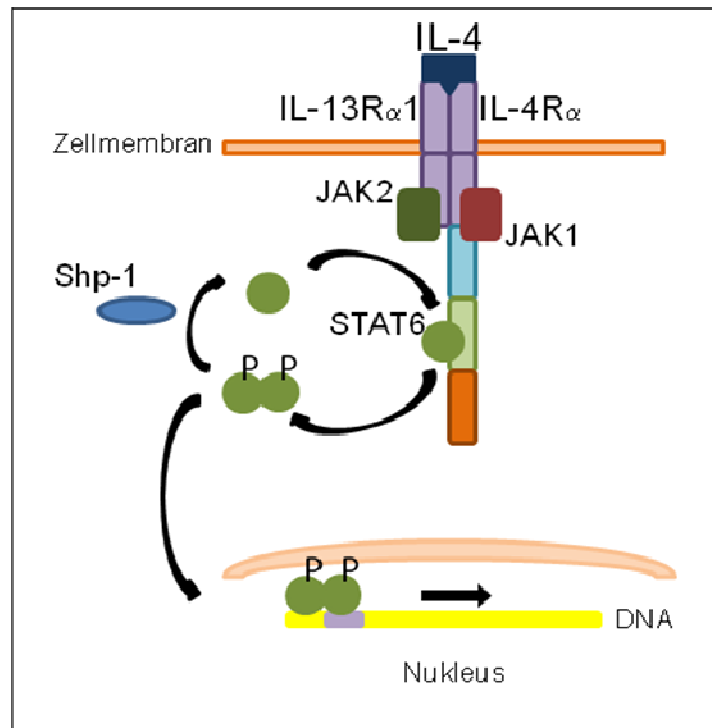


Abb. 22: Ausschnitt aus der IL-4 -Signaltransduktion in Endothelzellen. Die Bindung von IL-4 an die Rezeptoruntereinheit IL-4R α induziert die Heterodimerisierung mit der IL-13R α 1-Untereinheit. In Folge kommt es zur Tyrosin-Phosphorylierung an der zytoplasmatischen Domäne von IL-4R α durch aktivierte JAK. Dies ermöglicht die Phosphorylierung von STAT6, das anschließend homodimerisiert und im Kern an die Promotor-Region IL-4-regulierter Gene, wie z.B. dem OPG-Gen bindet. Die Dephosphorylierung des P-STAT6 erfolgt unter anderem durch die Phosphatase Shp-1 (Kelly-Welch et al., 2003).

Einer der durch den IL-4-Rezeptor aktivierten Signaltransduktionswege führt zur Tyrosin-Phosphorylierung von STAT6 (Signal transducer and activator of transcription), einem zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor. STAT6 dockt an ein zytoplasmatisches Tyrosin-Ende des IL-4R α an (Nelms et al., 1999), wird dort Tyrosin-phosphoryliert, dissoziiert wieder von IL-4R α , homodimerisiert durch

reziproke SH2-Domänen-Interaktion, wandert in den Kern und bindet an entsprechende DNA-Sequenzen im Bereich der Promotoren IL-4- und IL-13-regulierter Gene. Ein in der IL-4R α -JAK-STAT6-Kaskade beteiligtes Enzym scheint die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C zu sein, da deren Hemmung die IL-4-induzierte Aktivierung von JAK und die STAT6-Tyrosin-Phosphorylierung verhindert (Zamorano et al., 2003). Die Dephosphorylierung des P-STAT6 erfolgt unter anderem durch die Shp-1-Phosphatase (Hanson et al., 2003) (Abb. 22).

STAT6 spielt eine nachgewiesene Rolle in der T_H2-Polarisierung des Immunsystems (Hebenstreit et al., 2006), sowie in der Vermittlung von IL-4- und IL-13-Funktionen wie der Regulation allergischer Reaktionen (Pernis et al., 2002), der Förderung von Zellüberleben und -wachstum von Lymphozyten (Nelms et al., 1999; Zhu et al., 2002), der Hemmung der Osteoklastogenese (Abu-Amer Y, 2000) und der Induktion proinflammatorischer Reaktionen im Endothel (Khew-Goodall et al., 1999). In Zellen der Gefäßwand, in glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäßmedia (CASMC; Hofbauer et al., 2006) wie auch in Endothelzellen (HUVEC), werden die stimulierenden Effekte von IL-4 und IL-13 auf die OPG-Expression durch die Phosphorylierung von STAT6 vermittelt. Dies konnte durch Einsatz eines spezifischen Inhibitors der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (D-609) und damit effektiven Inhibitors der IL-4-induzierten STAT6-Phosphorylierung demonstriert werden (Zamorano et al., 2003). In dieser Arbeit verhindert dieser Phospholipase C-Inhibitor in Endothelzellen die durch IL-4-induzierte rapide STAT6-Phosphorylierung und ebenso die Steigerung der basalen OPG-mRNA-Spiegel und OPG-Protein-Sekretion. Dies zeigt neben der STAT6-Abhängigkeit der OPG-Produktionssteigerung unter IL-4-Exposition die Rolle der Phospholipase C als wichtiges Enzym der IL-4-Signaltransduktionskaskade in HUVEC. Die Aufhebung der IL-4-induzierten STAT6-Phosphorylierung, OPG-mRNA-Spiegel und OPG-Protein-Sekretion durch den löslichen IL-4-Rezeptor demonstriert, dass die stimulierenden Effekte des IL-4 physiologisch relevant sind und die IL-4-STAT6-OPG-Kaskade der spezifische Aktivierung des IL-4-Rezeptors bedarf. Neben STAT6 wurde in humanen Endothelzellen (HUVEC; Lee et al., 2003) auch eine Aktivitätssteigerung von STAT1 durch IL-4 beobachtet, die möglicherweise

für die IL-4 induzierte MCP-1-Expression von Bedeutung ist (Zhou et al., 1998; Lee et al., 2003).

Für die Funktion von IL-4 und IL-13 im Gefäßendothel werden neben den oben beschriebenen pro-inflammatorischen JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade die ebenfalls auf eine IL-4R α /IL-13R1 α -Aktivierung folgenden PI3K- und p38 MAPK-Signaltransduktionskaskaden beschrieben. Die p38 MAPK-Signaltransduktionskaskade ist an der Induktion der Expression pro-inflammatorischer Mediatoren beteiligt. Dazu gehören TNF- α , IL-1 β , IL-6, die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Guan et al., 1998; Saccani et al., 2002). Die Expression der Chemokine MCP-1 und IL-8 (Hall et al., 2005; Westra et al. 2005) sowie der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (Ju et al., 2003; Westra et al., 2005) wird ebenfalls auf diesem Weg induziert. Präklinische und klinische Studien mit spezifischen p38 MAPK-Inhibitoren unterstützen die These der Bedeutung dieser Signaltransduktionskaskade im Rahmen von vaskulären Entzündungsreaktionen (Fijen et al., 2001; Kumar et al, 2003). Selektive Inhibitoren der JAK/STAT-, PI3K- und p38-MAPK-Signaltransduktionskaskade schwächen die Überexpression proinflammatorischer Mediatoren in IL-4-stimulierten humanen Gefäßendothelzellen signifikant ab (Lee et al., 2006).

IL-4 reguliert in Endothelzellen eine Reihe von Genen, die für die Regulation von Entzündungsantwort, Apoptose, Signaltransduktion, Transkriptionsfaktoren, Stoffwechsel sowie andere bisher unbekannte Funktionen verantwortlich sind (Lee et al., 2004b). Seine inflammatorische Wirkung auf das Endothel übt IL-4 u.a. durch Induktion der Genexpression für das proinflammatorische IL-6 (Lee et al., 2004b), für VCAM-1 (Lee et al., 2001c) sowie E-Selektin (Lee et al., 2004b) aus, die als Oberflächen-Proteine auf Endothelzellen an der Rekrutierung der Leukozyten an vaskuläre Läsionen und deren Interaktion mit dem Endothel maßgeblich beteiligt sind. Für die ebenfalls zur Pathogenese der Atherosklerose beitragende Reticulocyte type 15-lipoxygenase (15-LO-I; Cyrus et al., 1999) konnte eine Induktion der Genexpression unter anderem in humanen Blut-Monozyten, alveolären Makrophagen und Gefäßendothelzellen durch IL-4 nachgewiesen werden (Lee et al, 2001c). IL-4 kann in Endothelzellen oxidativen

Stress induzieren (Walch et al., 2006), was wiederum die Expression von TNF- α (Lee et al., 2001a, 2001b) und MCP-1 (Lee et al., 2003) steigert. Entsprechend wurde für IL-13 die Induktion der endothelialen VCAM-1-Expression und MCP-1-Expression (Goebeler et al., 1997) und damit die Beteiligung an der Rekrutierung von Entzündungszellen und deren Transmigration durch das Endothel (Gu et al., 1999; Rollins et al., 1997) nachgewiesen. Aufgrund dieser vielfältigen Beteiligung an inflammatorischen und atherogenen Prozessen kann die Regulation der OPG-Produktion in Endothelzellen durch IL-4 und IL-13 als Bestandteil der inflammatorisch bedingten Atherogenese und Gefäßkalzifizierung angesehen werden. Möglicherweise wird OPG unter Exposition der Endothelzellen mit pro-atherogenen Zytokinen auch kompensatorisch als Schutzprotein zur Aufrechterhaltung der Integrität des Endothels vermehrt exprimiert.

5.2. Die Effekte von Interleukin-4 und Interleukin-13 auf den Knochenstoffwechsel

Die Effekte von IL-4 und IL-13 auf den Knochenstoffwechsel und die Struktur des Knochengewebes konnten bereits in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden. In ausgewachsenen IL-4^{-/-}- und IL-13^{-/-}-Mäusen konnten ein reduzierter Mineralgehalt und eine verminderte Stärke des kortikalen Knochens im Vergleich zu Wildtypmäusen beobachtet werden (Silverswärd et al., 2007). In Knochen neonataler Mäuse hemmte IL-4 die Knochenresorption (Ahlen et al., 2002) und ebenso, wie auch IL-13, die durch PTH, D₃, IL-1 β , TNF- α , IL-6 mit seinem löslichem IL-6-Rezeptor, Onkostatin M (OSM) und RANKL stimulierte Ca⁴⁵-Freisetzung aus der Calvaria der Maus (Palmqvist et al., 2006). Die IL-1 β -, IL-6 (+ sIL-6R)- und OSM-induzierte Knochenresorption wird durch die T_H2-Zytokine wahrscheinlich über eine Reduktion der COX2-Expression in Osteoblasten und damit verbundenen Unterdrückung der Prostaglandinsynthese gehemmt (Onoe et al., 1996; Kawaguchi et al., 1996; Palmqvist et al., 2006). Die Hemmung der durch PTH, D₃, TNF- α und RANKL induzierten Knochenresorption wird dagegen durch einen COX2-unabhängigen Mechanismus antagonisiert (Palmqvist et al., 2006). Wahrscheinlich erfolgt der Großteil der IL-

4- und IL-13-Effekte auf den Knochenstoffwechsel durch die Regulation der RANKL/RANK/OPG-Expression verschiedener Zellen. Dies impliziert unter anderem die bedeutende Rolle der T_H2 -Zytokine für den pathologischen Knochenmetabolismus im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Regulation der osteoklastären Aktivität, zumal Osteoklasten als die Initiatoren osteogener Umbauvorgänge gelten. Zur Analyse der Modulation der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität durch IL-4 und IL-13 über das OPG/RANKL-System wurde in dieser Arbeit ein *in vitro*-Modell etabliert, in dem Osteoklasten-Vorläuferzellen in Abhängigkeit von RANKL zu funktionsfähigen, Kollagen-resorbierenden Osteoklasten ausreifen.

Es bestätigt sich, dass mononukleäre Osteoklasten-Vorläuferzellen in diesem *in vitro* Osteoklasten-Assay unter alleiniger Exposition mit dem Osteoklasten-Zytokin M-CSF in Abwesenheit von RANKL nicht zu resorbierenden Osteoklasten ausreifen. Nur durch eine ausreichende Konzentration dieses Differenzierungs- und Aktivierungsfaktors lässt sich eine ausgeprägte osteoklastäre Resorptionsaktivität in diesem *in vitro* Modell erzielen. Analog entwickeln RANKL^{-/-}-Mäusen einen osteopetrotischen Phänotyp (Kong et al., 1999a). Weiterhin zeigt sich, dass weder der interzelluläre Kontakt mit Stromazellen des Knochenmarks noch mit osteoblastären Zellen für die Osteoklastogenese *in vitro* essentiell ist, solange RANKL in löslicher Form vorliegt. Die Ausdifferenzierung der osteoklastären Vorläuferzellen in Abwesenheit anderer Zellen ermöglicht die Analyse direkter Effekte exogen zugefügter Faktoren auf die Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität durch ihre Wirkung auf die Osteoklasten-Vorläuferzellen oder durch eine Beeinträchtigung der Wirksamkeit von M-CSF oder RANKL im Kulturmedium. Bei Wirksamkeitsverlust des einen oder anderen Proteins würde dies eine Minderung oder Hemmung der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivierung bedeuten (Teitelbaum, 2000; Doherty et al., 2004). In der Pathogenese vaskulärer Kalzifizierungs- und Ossifikationsprozesse könnte eine inadäquate Knochenresorption trotz Anwesenheit Osteoklasten-ähnlicher Zellen Folge von funktionsgestörten, inadäquat differenzierten Osteoklasten, eines relativen Mangels an M-CSF und/oder RANKL oder einer direkten oder indirekten Hemmung osteoklastärer Zellen durch zelluläre oder humorale Faktoren in der

Gefäßwand sein. Das Ausmaß der Knochenresorption wird vor allem durch das Verhältnis von RANKL zu OPG bestimmt (Yasuda et al., 1998), beides Faktoren, die u.a. von Stromazellen oder osteoblastären Zellen freigesetzt werden. Die meisten Osteoklastogenese-fördernden Substanzen verursachen eine Steigerung des RANKL/OPG-Quotienten mit einer Steigerung der osteoklastären Resorption infolge mangelnder Gegenregulierung über OPG. Die Datenlage zur Beurteilung einer Veränderung des RANKL/OPG-Quotienten bei pathologischen Gefäßprozessen ist jedoch noch unzureichend. Mäuse mit einer exzessiven oder defekten Produktion an RANKL/RANK/OPG bilden beide Extreme des skeletalen Phänotyps aus, eine Osteoporose bei OPG^{-/-} und eine Osteopetrose bei OPG-Transgen, RANKL^{-/-} und RANK^{-/-}, was die grundlegende Bedeutung dieses Zytokinsystems für den Knochenstoffwechsel widerspiegelt (Mizuno et al., 1998b; Kong et al., 1999; Bucay et al., 1998; Simonet et al., 1997).

Im hier verwendeten Osteoklasten-Assay konnte die Resorptionsaktivität der Zellen unter hinreichenden Konzentrationen an M-CSF und RANKL effektiv durch direkte Zugabe von IL-4 und IL-13 gemindert werden. Dies lässt vermuten, dass IL-4 und IL-13 auch in diesem *in vitro*-Modell einen hemmenden Effekt auf die osteoklastäre Funktion ausüben, der unabhängig von anderen zellulären Komponenten ist. Die T_H2-Zytokine scheinen direkt auf die osteoklastären Vorläuferzellen einzuwirken und ihre Ausdifferenzierung zu funktionsfähigen und aktiven Osteoklasten zu verhindern. Dieses steht im Einklang mit bereits in anderen Studien beschriebenen Beobachtungen zur Osteoklastogenese unter IL-4-Exposition. Kasono et al. (1993) beobachteten eine IL-4-induzierte Hemmung der durch PTH, D₃ und IL-1 α -induzierten Osteoklastogenese in Kulturen von Mäuse-Knochenmarkzellen. In einem *ex vivo*-Modell der Knochenresorption bei rheumatoider Arthritis konnte ein negativer Effekt von IL-4 auf die Präsenz der Osteoklasten demonstriert werden (Miossec et al., 1994), was ebenfalls eine Verminderung der Knochenresorption durch eine IL-4-induzierte Hemmung der Osteoklastogenese vermuten ließ. Der negative Effekt der T_H2-Zytokine auf die Knochenresorption über eine Beeinflussung der Osteoklastogenese und eine Verminderung der aktiv resorbierenden reifen Osteoklasten basiert wahrscheinlich auf der Fähigkeit von IL-4 und IL-13 osteoklastäre Vorläuferzellen direkt und

durch Veränderung des Expressionsprofils von osteoblastären Zellen indirekt zu hemmen (Palmqvist et al., 2006).

5.3. Modulation des skeletalen OPG/RANKL/RANK-Systems durch Interleukin-4 und Interleukin-13

Als zugrundeliegender molekularer Mechanismus der Regulation des Knochenstoffwechsels durch die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 wird insbesondere die Modulation der Expression der Komponenten des OPG/RANKL/RANK-Systems diskutiert. Es wird vermutet, dass durch die IL-4- und IL-13-Rezeptoraktivierung auf RANKL-sensitiven Zellen die auf die RANK-Aktivierung folgende intrazelluläre Signaltransduktion beeinflusst wird. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass IL-4 und IL-13 bei einer Dosis von 10 ng/ml sehr potente Osteoklastogenese-Inhibitoren sind und eine totale Blockade der RANK-Signaltransduktion durch die T_H2-Zytokine zu vermuten ist. Der hemmende Effekt des direkt applizierten IL-4 und IL-13 im Osteoklasten-Assay ist in seinem Ausmaß vergleichbar mit dem Effekt der totalen Restriktion an RANKL im Kulturmedium der Osteoklasten-Vorläuferzellen. In einem *in vitro*-Modell mit RAW264.7-Monozyten/Makrophagen und murinen Knochenmark-Vorläuferzellen hemmte IL-4 die RANKL-induzierte Osteoklastogenese ebenfalls bei einer Dosis von 10 ng/ml. IL-4 hemmte die RANKL-induzierte Expression von NFATc1 und die vorangeschaltete c-fos-Expression (Kamel Mohamend et al., 2005). Weitere Gruppen analysierten die auf IL-4-Rezeptoraktivierung intrazellulär in osteogenen Zellen folgende Signaltransduktion im Detail. So hemmte IL-4 die TRAF6-vermittelte Phosphorylierung von I κ B, was die Freisetzung und Translokation von NF- κ B in den Zellkern blockierte (Bendixen et al., 2001). IL-4 hemmte auch die Aktivierung und Signaltransduktion von JNK, p38 und ERK (Abu-Amer, 2001; Palmqvist et al., 2006), sowie die Expression von c-fos und NFAT2 (Takayanagi, 2005). Neben der negativen Beeinflussung der RANK-Signaltransduktion zeigte sich der Osteoklastogenese-hemmende Effekt von IL-4 und IL-13 auch auf Genexpressionsebene. Das Vorkommen von Rezeptoren für beide Zytokine auf osteoklastären Vorläuferzellen, die mit der RANK-Expression interferieren,

wurde durch Hemmung der basalen und Vitamin D₃-stimulierten RANK-mRNA-Expression in Calvaria der Maus, sowie in murinen Milzzellen, Makrophagen des Knochenmarks und Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 bestätigt. Die gehemmte RANK-mRNA-Expression ging mit einer verminderten RANK-Oberflächenexpression und einer fehlenden Ausdifferenzierung zu Osteoklasten einher (Palmqvist et al., 2006).

Die Kontrolle der Genexpression durch IL-4 und IL-13-Rezeptoren ist abhängig von der Homodimerisierung von STAT6 (Kelly-Welch et al., 2003), das auch in der Vermittlung der IL-4 und IL-13-Effekte auf Osteoblasten und osteoklastäre Vorläuferzellen mit Beeinflussung der Knochenresorption eine zentrale Rolle spielt (Palmqvist et al., 2006). Das STAT6-Dimer hemmt die NF- κ B- und JNK-Aktivierung, zwei zentrale Signaltransduktionswege der RANKL-RANK-induzierten Osteoklastogenese (Takayanagi et al., 2000; Wong et al., 1998; Yamamoto et al., 2001; David et al., 2002). IL-4 war nicht im Stande die RANKL-induzierte Osteoklastogenese in STAT6^{-/-}-Mäusen zu hemmen (Hirayama et al., 2005). Das Profil der mRNA-Spiegel von RANKL, OPG und RANK nach IL-4 und IL-13-Stimulation macht die Anwesenheit von spezifischen Rezeptoren auf Osteoblasten und osteoklastären Vorläufern wahrscheinlich. Die Zytokineffekte auf RANKL/RANK/OPG sind abhängig von der Aktivierung des IL-4-Rezeptors Typ 1, Typ 2 oder des IL-13-Rezeptors. IL-4 und IL-13 agierten hierbei annähernd äquipotent (Palmqvist et al., 2006). Von anderer Seite wurde berichtet, dass IL-4 gegenüber IL-13 in seiner Effektstärke auf osteoklastäre Vorläuferzellen überlegen sei (Yamada et al., 2007). Neben der Wirkung von IL-4 auf osteoklastäre Vorläuferzellen und auf die Osteoklastogenese, wurde auch von einer direkten Hemmung der RANKL-induzierten Knochenresorption reifer Osteoklasten durch IL-4 über eine Hemmung der RANKL-RANK-abhängigen intrazellulären Signaltransduktion berichtet (Mangashetti et al., 2005).

5.4. Interaktion von Endothelzellen mit Osteoklasten

Die Osteoklastogenese ist neben RANK-exprimierenden osteoklastären Vorläuferzellen auch von OPG/RANKL-exprimierenden Stromazellen des Knochenmarks bzw. osteoblastischen Zellen abhängig (Kim et al., 2005). Durch ihre direkten Effekte auf diese Zellen können IL-4 und IL-13 somit auch einen indirekten Einfluss auf die Osteoklastogenese ausüben. In der Calvaria der Maus konnte die Hemmung einer Vitamin D₃-induzierten gesteigerten RANKL-Expression und verminderten OPG-Expression durch die beiden T_H2-Zytokine antagonisiert und die Knochenresorption entsprechend vermindert werden (Palmqvist et al., 2002). Die indirekte Einflussmöglichkeit der T_H2-Interleukine auf die Osteoklastogenese, durch eine direkte Einwirkung auf Zellen, die mit Osteoklastenvorläufern interagieren, war die Grundlage der Analyse der Interaktion von IL-4- und IL-13-stimulierter Endothelzellen und osteoklastären Vorläuferzellen. Die Ausdifferenzierung RANKL/M-CSF stimulierter monozytärer Zellen und die Resorptionsaktivität im Osteoklasten-Assay werden durch den Zusatz von Kulturüberstand Zytokin-stimulierter Endothelzellen (HUVEC) in Abhängigkeit von der eingesetzten Zytokindosis gehemmt. Konstante Rahmenbedingungen lassen vermuten, dass die Minderung der osteoklastären Resorptionsaktivität allein auf die durch IL-4 bzw. IL-13 induzierte Änderung des endothelialen Expressionsprofils sezernierter löslicher Faktoren zurückzuführen ist. Ein direkter Effekt des IL-4 auf die Osteoklasten-Funktion durch einen Überhang im eingesetzten Kulturüberstand der endothelialen Ko-Kultur kann ausgeschlossen werden, da sich unter Zugabe des spezifischen löslichen IL-4-Rezeptors keine Änderung der beobachteten Effekte zeigt.

Bei der Hemmung der Osteoklastogenese über Einwirkung auf Osteoblasten verminderten IL-4 und IL-13 die osteoblastäre RANKL-Expression und steigerten die OPG-Expression (Palmqvist et al., 2006). Ähnlich beeinflusste IL-4 die RANKL- und die OPG-Expression in humanen fibroblastenähnlichen Synoviozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und verhinderte so die Osteoklastenformation in Vitamin D₃-stimulierten Ko-Kulturen von Synoviozyten und humanen Monozyten des peripheren Blutes (Lerner, 2000). Bei Kollagen-induzierter Arthritis in Mäusen zeigte sich eine durch IL-4 reduzierte Expression

der RANKL-mRNA in synovialen Extrakten (Lubberts et al., 2000). Es ist zu vermuten, dass die Hemmung der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität in dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Modell über eine Modulation der Expression der Komponenten des RANKL/OPG-Systems in Endothelzellen durch IL-4 und IL-13 erfolgt.

Aufgrund ausreichender Konzentration an RANKL im Kulturmedium der Osteoklasten-Vorläuferzellen und der gesteigerten OPG-Produktion in HUVEC unter IL-4 und IL-13-Exposition in Abhängigkeit von deren Dosis ist zu vermuten, dass eine Verschiebung des RANKL/OPG-Quotienten zugunsten von OPG an der Hemmung beteiligt ist. Würde der Effekt des Ko-Kulturüberstandes auf die Resorptionsaktivität im Osteoklasten-Assay nur durch das Auftreten von OPG im Kulturmedium zu erklären sein, wäre ein humaner, spezifisch OPG neutralisierender Antikörper in ausreichender Konzentration in der Lage, diesen Effekt aufzuheben. Durch Vorinkubation des eingesetzten endothelialen Kulturüberstandes mit diesem Antikörper würde das darin befindliche OPG komplexiert und damit unfähig RANKL im Kulturmedium der Osteoklasten-Vorläufer zu binden und so zu neutralisieren. Es zeigt sich, dass der OPG-Antikörper die durch IL-4-stimulierten HUVEC-Kulturüberstand erzeugte Hemmung der Osteoklastendifferenzierung und Osteoklastenaktivierung in Abhängigkeit von seiner Dosierung signifikant abschwächt. Das von HUVEC sezernierte OPG scheint daher ein Mediator der IL-4-induzierten indirekten Effekte auf die Osteoklastogenese zu sein.

Eine vollkommene Aufhebung des hemmenden Effektes IL-4-exponierten Endothelzellmediums und eine optimale Osteoklastendifferenzierung in diesem Osteoklasten-Assay kann allerdings auch durch Steigerung der Antikörper-Dosis auf ein Vielfaches der ND_{50} nicht erreicht werden. Daher ist anzunehmen, dass neben OPG noch weitere unter IL-4-Exposition in HUVEC induzierte Faktoren an der Hemmung der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivierung beteiligt sind.

Die Befunde konnten trotz der Variabilität der Primärzellen wiederholt reproduziert werden. Die Interaktion von IL-4-exponierten Endothelzellen und osteoklastären Zellen scheint somit interindividuell durch denselben zugrundeliegenden Mechanismus, nämlich der IL-4-induzierten Aktivierung des

Endothels mit konsekutiver Veränderung im Expressionsprofil löslicher Faktoren erklärt zu werden.

Chikatsu et al. (2002) beobachteten in einem Modell der Osteoklasten-Endothelzell-Interaktion mit Zellen der Maus, dass konditioniertes Medium von Endothelzellen die Bildung osteoklastärer Zellen aus einer Knochenmarkzellkultur und Milzzellkultur verhinderte und dieser Effekt durch löslichen RANKL nicht aufgehoben werden konnte. Eine OPG-Messung ergab, dass im Medium eingesetzter Endothelzellen die OPG-Konzentrationen signifikant geringer waren, als im konditionierten Medium von Knochenmarkzellen, dass keinen Effekt auf die Osteoklastogenese hatte (Chikatsu et al., 2002). Dies spricht gegen OPG als primären endothelialen Hemmfaktor. In der hier vorliegenden Arbeit wird jedoch demonstriert, dass Osteoklasten-Vorläuferzellen in Kulturmedium mit Zusatz von OPG-haltigem Kulturüberstand unstimulierter HUVEC in ihrer Ausdifferenzierung und Aktivierung im Vergleich mit Kulturen unter optimalen Differenzierungsbedingungen ohne Zusatz von Endothelzellmedium signifikant gehemmt werden. Dieser Effekt kann durch einen neutralisierenden OPG-Antikörper vollständig aufgehoben werden und so eine Osteoklastendifferenzierung ähnlich der unter optimalen Kulturbedingungen ermöglicht werden. OPG ist hier der zentrale Mediator der parakrinen Osteoklastogenese-Hemmung durch Endothelzellen.

Die beobachtete Variabilität der Interaktion von Endothelzellen und Osteoklasten gemessen an der Einschränkung der osteoklastären Resorptionsaktivität lässt sich am ehesten durch eine interindividuell unterschiedlich ausgeprägte basale OPG-Produktion und Stimulierbarkeit der HUVEC in Abhängigkeit von exogenen und endogenen, nicht kontrollierten Faktoren erklären. An exogenen Faktoren, die vor allem in dem Zeitraum von Abnabelung bis erfolgter Präparation der HUVEC und damit Überführung in standardisierte Kulturbedingungen einen Einfluss haben, sind möglicherweise die Transportdauer und Latenzzeit bis zur Verarbeitung, Lagerung, Temperaturschwankungen, Enzymaktivierung, Präpariereffizienz und Anwachsverhalten während der ersten 24 h in Kultur von Bedeutung. An endogenen Faktoren, die schon während der Schwangerschaft Einfluss auf die Endothelzellen der Nabelschnurvene haben, spielen möglicherweise das Alter der

Mutter, der Gesundheitszustand (z. B. vorbestehende Gefäßerkrankungen) und der Hormonspiegel, insbesondere von Östrogenen und Progesteron, eine Rolle. Trotz der Variabilität der basalen OPG-Produktion und der Stimulierbarkeit der HUVEC konnten konstante Ergebnisse erzielt werden, die zeigen, dass OPG ein bedeutender Mediator endothelialer Effekte auf den Osteoklastenstoffwechsel *in vitro* ist und dass Endothelzellen aktiv über eine Expression und Sekretion parakrin wirkender Mediatoren an der Regulation osteogener Prozesse in der Gefäßwand beteiligt sein können.

5.5. Vaskuläre Kalzifizierungen

Die Angiogenese geht in keinem Gewebe außer dem Knochen mit der Induktion der Osteoklastogenese und der nachfolgenden Resorption kalzifizierter Matrix einher (Matayoshi et al. 1996; Matsuzaki et al., 1998, Tanaka et al., 2007). Möglicherweise können nur kalzifizierende Gewebe wie Knochen über spezifische Signale die endotheliale Hemmung der Osteoklastogenese unterdrücken, was wiederum verhindert, dass sich in anderen Geweben als im Knochen funktionsfähige Osteoklasten ausbilden. Eine Störung der Endothel-Osteoklasten-Interaktion könnte somit zu übermäßiger Knochenresorption wie bei Osteoporose oder zum gestörten Abbau kalzifizierender Matrix wie bei der vaskulären Kalzifizierung beitragen.

In den Gefäßen zirkulieren proresorptive Zytokine und Osteoklasten-Vorläuferzellen (Fujikawa et al., 1996, 2001; Shalhoub et al., 2000, Seta et al., 2008), die durch spezifische Interaktionen mit vaskulären endothelialen Zellen ins umliegende Gewebe rekrutiert werden können (McGowan et al., 2001). Zudem konnten in kalzifizierten Läsionen der Gefäßwand Osteoklasten-ähnliche Zellen und monozytäre Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Jeziorska et al., 1998; McGowan et al., 2001). Es ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, ob in Gefäßkalzifizierung tatsächlich ausdifferenzierte funktionsfähige Osteoklasten lokalisiert sind oder dort nur Osteoklasten-ähnliche Zellen mit unzureichend ausgebildeter Resorptionskapazität anzutreffen sind. So wurden in ossifizierenden Arealen der Gefäßwand neben Osteozyten unvollständig differenzierte

Osteoklasten gefunden (Al-Fakhri et al., 2005). Molekulare *in vivo*-Bildgebung zeigte eine positive Korrelation von osteogenetischer Aktivität und Progression atherosklerotischer Plaques in der Aortenwand von apoE^{-/-}-Mäusen (Aikawa et al., 2007). Weiterhin wurden multinukleäre Osteoklasten-ähnliche Zellen u.a. in kalzifizierten Läsionen bei OPG^{-/-}-Mäusen (Min et al., 2000; Bucay et al., 1998) und in kalzifizierten Plaques der humanen Aorta (Tyson et al., 2003) beobachtet. Diese Befunde lassen vermuten, dass möglicherweise eine unzureichende Differenzierung oder eine Funktionsstörung der Osteoklasten durch unzureichende Resorption mineralisierter Matrix vaskuläre Kalzifizierungen bzw. Ossifikationen begünstigen.

Osteozyten in ossifizierenden Gefäßwandarealen sprechen für einen aktiven Umbauprozess in diesen Regionen (Al-Fakhri et al., 2005, Aikawa et al., 2007). Die aktive Knochenbildung durch Osteoblasten-ähnliche Zellen wird als eine der Hypothesen der vaskulären Kalzifizierung diskutiert (Demer, 1995; Bostrom et al., 1993). Dabei wurden die Interaktionen vaskulärer und osteogener Faktoren und die Beteiligung von Zellen beider Systeme genauer analysiert. Das Vorkommen Osteoblasten-ähnlicher Zellen in der Gefäßwand mag dabei verschiedene Ursprünge haben. Zum einen zeigen vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) die Fähigkeit zur Transdifferenzierung zu einem osteoblastischen Phänotyp, der unter Stimulation mit Bone morphogenic protein 2 (BMP2) und Bone morphogenic protein 4 (BMP4, Hruska et al., 2005) eine kalzifizierende extrazelluläre Matrix produziert. BMPs werden u.a. durch Endothelzellen, Schaumzellen und glatte Muskelzellen der Gefäßwand gebildet (Csiszar et al., 2005; Shin et al., 2004; Dhore et al., 2001; Bostrom et al., 1993). Die endotheliale Dysfunktion unter Hypoxie (Bouletreau et al., 2002), oxidativem Stress (Mody et al., 2001) oder turbulentem Blutfluss (Sorescu et al., 2003, 2004) und die Aktivierung des Endothels durch Entzündungsmediatoren und oxidierte LDLs (Cola et al., 2004) gehen unter anderem mit einer gesteigerten Expression von BMPs einher (Chang et al., 2007). Eine Konzentrationsminderung an anorganischen Pyrophosphaten (Johnson et al., 2006; Towler et al., 2005; Rutsch et al., 2003) fördert ebenfalls die Umwandlung von VSMCs in osteoblastäre Zellen mit gesteigerter Expression osteogener Transkriptionsfaktoren (Moe et al., 2003; Nakashima et al., 2002; Chen et al., 2002; Shanahan et al., 1999). Erhöhte

Kalzium- und Phosphat-Serumkonzentrationen können die Freisetzung kalzifizierender Matrixvesikel durch VSMCs stimulieren (Reynolds et al., 2004). Eine spezielle Untergruppe der VSMCs, die sogenannten CVCs (Calcifying vascular cells) zeigen zudem *in vitro* die Fähigkeit zur spontanen Kalzifizierung und Ausbildung knochenartiger Strukturen (Yang et al., 2004; Watson et al., 1994; Bostrom et al., 1993). Zu den zellulären Akteuren der Osteogenese in der Gefäßwand zählen außerdem gefäßwandständige Perizyten, die nach Aktivierung einen osteochondrogenen Phänotyp annehmen können (Farrington-Rock et al., 2004; Gerhardt und Betsholtz, 2003; Doherty und Canfield, 1999) und mesenchymale Stammzellen der Gefäßwand (Abedin et al., 2004b). Alternativ ermöglicht die Neovaskularisierung kalzifizierender Areale der Gefäßwand die Einwanderung von Perizyten, die phänotypisch eher den CVCs ähneln und zu einem osteoblastären Phänotyp differenzieren können (Doherty et al., 1998) sowie die Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (Collett und Canfield, 2005; Abedin et al., 2004b) (Abb. 23).

Aufgrund der beobachteten humoralen Interaktion von Endothelzellen und osteoblastischen Zellen sowie der Rolle von Gefäßmuskelzellen am Prozess der Kalzifizierung liegt es nahe, dass eine Interaktion vaskulärer Zellen mit osteoklastären Zellen auch von funktioneller Relevanz ist.

Die Mineralisierung der Gefäßwand scheint durch eine Dysbalance der Knochenbildung und Knochenresorption zu erklären zu sein, die mit einer gesteigerten und unzureichend antagonisierten Mineralisierung extrazellulärer Matrix einhergeht (Min et al., 2000). Shanahan et al. (1999) beobachteten beispielsweise neben der Expression von Knochenmatrixproteinen eine verminderte Expression des Kalzifizierungs-hemmenden Matrix Gla Protein (MGP) in medialen Kalzifizierungen. Dies spricht für einen Mangel an Inhibitoren der Mineralisierung und einem Überangebot an Osteogenese-fördernder bzw. Osteoklastogenese-hemmender Faktoren in der Gefäßwand als ein weiterer Pathomechanismus der Gefäßwandkalzifizierung.

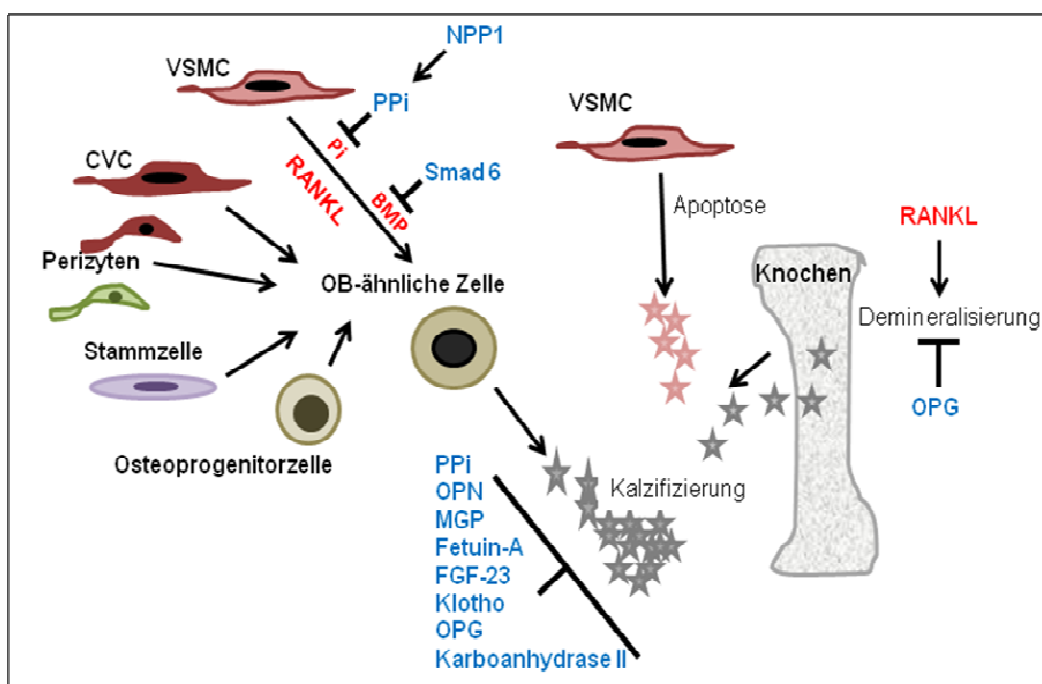


Abb. 23: Inhibitoren und Promotoren der Kalzifizierung. Neben der Ablagerung vermehrt aus dem Knochen freigesetzter Minerale im vaskulären Gewebe vermutet man, daß Osteoblasten-ähnliche Zellen aktiv zur extraskeletalen Kalzifizierung beitragen. Diese können aus verschiedenen Vorgängerzellen differenzieren. Reste apoptotischer glatten Gefäßmuskelzellen können dabei als Mineralisierungsgrundlage dienen. Eine Reihe von Kalzifizierungsinhibitoren (blau) wurde in Tiermodellen charakterisiert: Klotho/Fibroblast growth factor (FGF)-23, Matrix Gla Protein (MGP), Fetuin A, Mothers against decapentaplegic homolog 6 (Smad6), Nukleotid Pyrophosphatase /Phosphodiesterase 1 (NPP1), Karboanhydrase II, Osteopontin (OPN) und OPG.

Als molekulare Determinanten der vaskulären Kalzifizierung wurden bisher Klotho/Fibroblast growth factor receptor (FGFR) /Fibroblast growth factor 23 (FGF), ein Komplex von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Phosphathaushaltes (Renkema et al., 2008; Nabeshima et al., 2008; Kuro-o et al., 1997; Shimada et al., 2004), Matrix Gla Protein (MGP) als Kalzifizierungsinhibitor der extrazellulären Matrix (Luo et al., 1997) und der zirkulierende Kalzifizierungsinhibitor Fetuin-A (α -Heremans-Schmid-Glykoprotein) (Schäfer et al., 2003) beschrieben. Ebenfalls sind das für Mothers against decapentaplegic homolog 6 (Smad6), eines Inhibitors der BMP-Signaltransduktion, kodierende Gen Mothers against decapentaplegic homolog 6 (Madh6; Galvin et al., 2000), die Nukleotid- Pyrophosphatase/Phosphodiesterase-1 (NPP1; Johnson et al., 2005)

und die Karboanhydrase II (Spicer et al., 1989) an der vaskulären Kalzifizierung beteiligt. Die Rolle von Osteopontin (OPN) wurde nur im Doppelknockout mit $MGP^{-/-}$ (Speer et al., 2002) und Osteoprotegerin $^{-/-}$ (Bucay et al., 1998) untersucht, deren Genablation vaskuläre Kalzifizierungen im Mausmodell verursachte (Abb. 23).

OPG wird hier als zentrales molekulares Verbindungsglied vaskulärer und osteogener Prozesse diskutiert. OPG und RANKL werden im vaskulären System von Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert (Malyankar et al., 2000; Simonet et al., 1997; Collin-Osdoby et al., 2001; Kim et al., 2003). Bei Entzündungsreaktionen könnten auch dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Thrombozyten (OPG; Yun et al., 1998; Chagraoui et al., 2003), Mastzellen und T-Lymphozyten (RANKL; Wong et al., 1997a; Ali et al., 2006), sowie die zellulären Vertreter des Knochengewebes als Quellen hinzukommen. Wie die Ergebnisse dieses Projektes zeigen, ist die OPG-Expression und -Sekretion von Endothelzellen unter IL-4-Stimulation an der Hemmung der Osteoklastogenese beteiligt und wird zusätzlich von anderen Endothel-abstammenden Faktoren in ihrer Hemmwirkung auf Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivierung verstärkt. Die kurzzeitige Exposition von CASC mit IL-4 induzierte ebenfalls eine Steigerung ihrer OPG-Produktion, bei ähnlich dosiertem IL-4-Zusatz wie in diesem Projekt. Interessanterweise nahm unter Langzeit-Exposition mit IL-4 die OPG-Produktion der CASC ab, was mit einer zunehmenden Kalzifizierung dieser Zellen und der Expression des osteoblastären Transkriptionsfaktors *cbfa-1* einherging (Hofbauer et al., 2006). Die genaue Beteiligung der Zytokine IL-4 und IL-13 an vaskulär kalzifizierenden Prozessen und die Implikation ihrer Modulation des OPG/RANKL-Systems in extraskelatalen Mineralisierungsprozessen ist jedoch noch unklar.

5.6. Effekte von Osteoprotegerin im Gefäßsystem

Den ersten Hinweis auf eine Assoziation des skeletalen Knochenstoffwechsels mit dem Gefäßsystem über OPG lieferte eine Studie mit $OPG^{-/-}$ -Mäusen, die neben einer schweren Osteoporose größtenteils ausgeprägte arterielle Kalzifizierungen

der medialen Gefäßwandschicht von Aorta und renalen Arterien, Kalzifizierungen der Subintima der Aorta sowie die Ausbildung einer knochenähnlichen extrazellulären Matrix in der Gefäßwand zeigten (Bucay et al., 1998; Min et al., 2000). Die transgene Überexpression von OPG von Mitte der Schwangerschaft an bis ins Erwachsenenalter konnte die Gefäßmineralisierung bei OPG^{-/-}-Mäusen komplett verhindern (Min et al., 2000). Zusammen mit den protektiven Effekten von OPG in Tiermodellen vaskulärer Kalzifizierungen (Price et al., 2001) und der Ausbildung von gesteigerter Atherosklerose und medialen Kalzifizierungen bei OPG^{-/-}-ApoE^{-/-}-Mäusen (Bennett et al., 2006), spricht dies für eine protektive Funktion von OPG gegen eine pathologische Mineralisierung der Gefäßwand. In japanischen OPG^{-/-}-Mäuse, die normalerweise keine vaskuläre Kalzifizierung zeigen, kann im Gegensatz zu OPG^{+/-} und OPG^{+/+}-Mäusen durch eine Phosphatreiche Diät und zusätzliche 1 α ,25 Dihydroxyvitamin D₃-Injektion eine Kalzifizierung der Aorten-Media induziert werden, da OPG als vaskuloprotektiver Faktor fehlt. Es wurde vermutet, dass die Kalzifizierungs-hemmenden Eigenschaften des OPGs von einer Herabregulation der alkalischen Phosphatase herrühren (Orita et al., 2007).

Die hohe klinische Prävalenz und Koinzidenz arterieller Kalzifizierung und kardiovaskulärer Erkrankungen bei postmenopausalen Frauen und älteren Menschen mit Osteoporose könnte die These der Rolle des OPG/RANKL-Zytokinsystems als zentralem Regulationssystem auch beim Menschen unterstützen (Hak et al., 2000; Kado et al., 2000). Während im Knochen mit zunehmenden Alter die OPG-Produktion durch Zellen des Knochengewebes abnimmt (Makhluf et al., 2000), steigt die zirkulierende OPG-Konzentration im Serum an (Browner et al., 2001; Szulc et al., 2001), was möglicherweise den Versuch einer zentralen Gegenregulationsmaßnahme gegen den weiteren Schwund von Knochensubstanz im Skelettsystem darstellen könnte. Es wurde eine positive Korrelation der OPG-Serum-Konzentration mit einer Steigerung des Knochenumsatzes und der Schwere der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen unabhängig vom Alter (Yano et al., 1999) beobachtet. Weitere Assoziationen einer erhöhten OPG-Serum-Konzentration zeigten sich mit Diabetes mellitus und chronischer Niereninsuffizienz, Hochrisikokollektiven für Gefäßerkrankungen (Collin-Osdoby, 2004). Bei Diabetikern korrelieren die

erhöhten OPG-Serum-Konzentrationen ebenfalls mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität unabhängig vom Alter (Browner et al., 2001). Zusammengefasst lassen diese Beobachtungen bei Mensch und Tier annehmen, dass OPG als vaskulo- und osteoprotektiver Faktor bei pathologisch-resorptiven oder allgemein degenerativen Knochenumbauvorgängen und potentiell gefäßschädigenden Gesamtsituationen, wie z.B. bei der Atherosklerose vermehrt produziert wird. Ein Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen trotz erhöhter lokaler und systemischer Konzentrationen an OPG könnte sich somit auch durch eine zunehmende Resistenz des vaskulären Gewebes gegenüber OPG erklären. Da OPG eine Komponente eines interagierenden Zytokinsystems ist und eine Steigerung der OPG-Konzentration eine Minderung der RANKL-Konzentration bedingt (Hofbauer, Schoppet, 2004), könnte sowohl eine gestörte Balance der Komponenten OPG und RANKL, als auch eine veränderte Ansprechbarkeit der Zellen auf diese Zytokine das molekulare Korrelat der vaskulären kalzifizierenden und ossifizierenden Prozesse darstellen.

In der gesunden Gefäßwand sowie in frühen atherosklerotischen Läsionen in humanem Gewebe konnten immunhistochemisch OPG-Protein und geringe Mengen RANKL-Protein nachgewiesen werden (Dhore et al., 2001). Bei der Analyse von kalzifizierten Karotiden zeigte sich in den Explantaten von symptomatischen Patienten eine 2- bis 4-fach höhere OPG-Konzentration, als in denen von asymptomatischen Patienten (Golledge et al., 2004). In fortgeschrittenen Stadien bei bereits kalzifizierenden Läsionen wurde RANKL in der extrazellulären Matrix angrenzend an die kalzifizierten Areale, OPG in Arealen heterotoper Ossifikation nachgewiesen (Dhore et al., 2001). RANKL- und RANK-Transkripte fanden sich auch bei OPG^{-/-}-Mäusen in kalzifizierten Läsionen der Arterien, in der Nähe zu Osteoklasten-ähnlichen Zellen, nicht jedoch in den gesunden Gefäßen der Wildtyp-Mäuse (Min et al., 2000). Während sich in der nicht-atherosklerotischen Gefäßwand von ApoE^{-/-}-Mäusen in der immunhistochemischen Färbung nur OPG und RANK nachweisen ließen, zeigten atherosklerotische Plaques eine deutliche Expression von RANKL (Sandberg et al., 2006). Rattazzi et al. (2005) beobachteten in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen von ApoE^{-/-}-Mäusen die Deposition von Hydroxyapatit durch OPG-exprimierende Chondrozyten-ähnliche Zellen. Der

genaue Mechanismus der Aktion von OPG und die Implikation der RANKL/OPG-Interaktionen in der vaskulären und skeletalen Pathobiologie sind im Detail noch unklar. Es wird vermutet, dass OPG gefäß- und knochenprotektiv durch Neutralisierung sowohl von RANKL, als auch von TRAIL wirkt. Erhöhte RANKL- und RANK-Expressionen fanden sich in den Monozyten von Patienten mit instabiler Angina pectoris. RANKL stimulierte diese Monozyten zu einer gesteigerten Expression von Monocyte chemoattractant peptide (MCP)-1 und induzierte in vaskulären glatten Muskelzellen eine erhöhte Aktivität an Matrix-Metalloproteinasen (Sandberg et al., 2006), die zur Vulnerabilität und Rupturanfälligkeit von Plaques beitragen. Des Weiteren übt eine erhöhte RANKL-Expression antiapoptotische Effekte auf das Endothel aus, fördert die Neoangiogenese, die als wichtiges Element der Entwicklung kalzifizierender Gefäßwandläsionen angesehen wird (Kim et al., 2003; Johnson et al., 2006) und steigert die vaskuläre Permeabilität und Leukozyteninfiltration im murinen Modell (Min et al., 2007). *In vitro* Studien mit Myofibroblasten der Herzklappen zeigten, dass RANKL durch Steigerung der Expression osteoblastärer Gene eine Kalzifizierung induzieren kann (Kaden et al., 2004) - eine Beobachtung die für OPG als Kalzifizierungsinhibitor durch RANKL-Neutralisierung spricht.

Neben der Expression von RANKL und OPG war eine Ko-Lokalisation der Expression von OPG und TRAIL in Randbereichen des Osteoids in unmittelbarer Umgebung apoptotischer Areale kalzifizierter Läsionen in humanen Gefäßen zu beobachten. In gesunden Gefäßwänden fanden sich dagegen weder Bereiche mit einer verstärkten Apoptose, noch TRAIL-Expression (Schoppet et al., 2004). OPG fungiert auch als neutralisierender Rezeptor für TRAIL, das auf auto- oder parakrine Weise die Apoptose induzieren kann (Wiley et al., 1995; Degli-Esposti, 1999; Emery et al., 1998) und fördert dadurch das Überleben von Endothelzellen (Pritzker et al., 2004). Das gemeinsame Auftreten von OPG und TRAIL in apoptotischen Arealen könnte auf einen reaktiven Anstieg des Schutzfaktors OPG hindeuten. Ferner wirkt OPG ebenfalls als autokriner, anti-apoptotischer Überlebensfaktor in Endothelzellen, was zur Integrität des Endothels beitragen kann. OPG wird dabei nach Bindung von Osteopontin an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermehrt produziert (Malyankar et al., 2000). Es wurde allerdings auch demonstriert, dass OPG die Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen steigern konnte, wenn diese

Zellen *in vitro* mit OPG in einer Dosierung behandelt wurden, die der in atherosklerotischem Gewebe gemessenen OPG-Konzentration entsprach (Moran et al., 2005). In frühen Stadien der Atherosklerose kann die Apoptose vaskulärer Zellen jedoch protektiv für die Gefäßwand sein, da sie die Stabilität der Plaque fördert und einem akuten kardiovaskulären Ereignis eher vorbeugt (Fujii et al., 2005; Abedin et al., 2004a).

Bei fortgeschrittenen Plaques kommt es jedoch zum vermehrten Untergang von Zellen in Kombination mit einer in diesem Stadium der Gefäßläsion meist beeinträchtigten phagozytären Kapazität der Makrophagen. Die abgestorbenen Zellen akkumulieren, was zu einer Destabilisierung und Ruptur des Plaques führen kann (Bennett, 2002; Clarke et al., 2006; Schrijvers et al., 2007). Die Apoptose der Zellen der Gefäßwand wird als eine weitere Kalzifizierungshypothese als Initiator der vaskulären Kalzifizierung *in vitro* diskutiert, wobei die apoptotischen Zellfragmente möglicherweise eine Grundlage für die Mineralisierung bilden (Proudfoot et al., 2000). Apoptotische Zellen scheinen weiterhin durch Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen zur Kalzifizierung beizutragen, wobei Phosphationen zudem die osteogene Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen induzieren können (Jono et al., 2000; Cotmore et al., 1971). Die zunehmende Ausdehnung der Kalzifizierung kann dann zusätzlich das Rupturrisiko erhöhen (Abedin et al., 2004a). Möglicherweise kann OPG durch Verhinderung des Abbaus kalzifizierter Matrix zwar in frühen atherosklerotischen Läsionen das Risiko einer Ruptur mindern, verliert jedoch in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen seine Funktionsmöglichkeit als protektiver Faktor.

6. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind für die Morbidität und Mortalität einer alternden Bevölkerung von zentraler Bedeutung und machen statistisch mehr als die Hälfte aller Todesursachen bei über 70-Jährigen aus. Vor allem die (neo)-intimale Gefäßkalzifizierung atherosklerotischer Läsionen ist mit einem deutlich erhöhten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert und lässt sich bereits präklinisch mit nicht-invasiven Methoden nachweisen. Der Kalzifizierung des Gefäßsystems liegt ein Mineralisierungsprozess zugrunde, der große Ähnlichkeiten mit dem Knochenstoffwechsel aufweist. Das Zytokin RANKL, sein Rezeptor RANK und der Rezeptorantagonist OPG gelten als essenzielle Regulatoren der Osteoklasten-Zellbiologie. OPG wird nicht nur von Knochenzellen, sondern auch von Zellen des Immunsystems und des Gefäßsystems sezerniert. Aufgrund des kombinierten Phänotyps einer Osteoporose und einer Gefäßkalzifizierung von OPG^{-/-}-Mäusen gilt OPG als zentrales Bindeglied zwischen dem Knochen- und dem Gefäßsystem im Rahmen der vaskulären Kalzifizierung.

Im mehrstufigen Prozess der Atherosklerose mit (neo)-intimaler Gefäßkalzifizierung stellt das Endothel einen wichtigen Garanten der Wandintegrität dar. Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurden primäre humane Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVEC), ein etabliertes Zellmodell zur Endothel-Zellbiologie, verwendet. In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 die Expression von OPG modulieren, über welche Signalwege diese Regulation abläuft und ob endotheliales OPG imstande ist, die Funktion von Osteoklasten zu kontrollieren.

Im ersten Teil wurde die Regulation der endothelialen OPG-Expression durch humorale Faktoren analysiert, die in der Pathogenese von Atherosklerose und Gefäßkalzifizierung diskutiert wurden. Dazu zählen die partiell homologen T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13. Die Analyse der endothelialen OPG-mRNA-Spiegel mittels Northern Blot und der OPG-Protein-Sekretion mittels ELISA zeigt, dass IL-4 und IL-13 dosis- und zeitabhängig die endotheliale OPG-Expression auf mRNA- und Proteinebene um das 3- bis 4-fache steigern. Dies kann durch Zugabe

eines löslichen IL-4-Rezeptors komplett gehemmt werden, was für einen Rezeptor-vermittelten Effekt spricht. Die IL-4- und IL-13-induzierte Steigerung der endothelialen OPG-Expression ist von der STAT6-Phosphorylierung abhängig. Sie kann durch Hemmung der für die STAT6-Phosphorylierung erforderlichen Phospholipase C spezifisch blockiert werden. Diese Befunde belegen eine sequenzielle Signalkaskade von IL-4/IL-13 über den IL-4-Rezeptor und STAT6 bei der Regulation der OPG-Produktion in humanen Endothelzellen.

Im zweiten Teil wurden die Interaktionen humaner Endothelzellen mit osteoklastären Vorläuferzellen *in vitro* analysiert. Diese Untersuchungen dienten der Klärung der Frage, ob von Endothelzellen sezerniertes OPG die Funktion von Osteoklasten reguliert. Für die Quantifizierung dieser Effekte wurde ein funktioneller Osteoklastenassay etabliert und validiert, der die Differenzierung und Aktivierung erfasst. Die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 hemmen die Osteoklasten-Aktivität direkt und dosisabhängig um 87%. Von Endothelzellen konditioniertes Medium nach Behandlung mit IL-4 und IL-13 zeigt eine parakrine Hemmung der Osteoklasten-Aktivität. Diese ist abhängig von der zuvor verwendeten Zytokindosis. Die Hemmung der Osteoklasten-Aktivität durch den Transfer von Medium unstimulierter humaner Endothelzellen kann durch einen neutralisierenden OPG-Antikörper komplett aufgehoben werden, nicht aber durch einen unspezifischen Kontroll-Antikörper. Somit stellt OPG den wesentlichen parakrinen Faktor dar, über den Endothelzellen die Funktion von Osteoklasten hemmen können. Der hemmende Effekt der Endothelzellen nach vorheriger Stimulation mit IL-4 auf die Osteoklastenaktivität wird hingegen durch den OPG-Antikörper lediglich abgeschwächt. Dies spricht für eine Freisetzung weiterer Regulatoren der Osteoklastenaktivität durch IL-4.

Zusammenfassend stimulieren IL-4 und IL-13 über eine STAT6-Aktivierung die OPG-Produktion humaner Endothelzellen. OPG aus Endothelzellen stellt einen spezifischen Hemmmechanismus der Osteoklastenaktivität dar. Diese Daten belegen die Bedeutung von OPG als Bindeglied zwischen Gefäßbiologie und Knochenstoffwechsel. Die Hemmung der Osteoklastenaktivität durch OPG könnte eine Gefäßkalzifizierung begünstigen, da die mineralisierte Knochenmatrix dadurch weniger effektiv aus der Gefäßwand entfernt wird.

7. Conclusion

Cardiovascular diseases represent the major cause of morbidity and mortality of the aging population. Statistically more than a half of the people after the age of 70 years had died from cardiovascular disease. The (neo)-intimal calcifications of atherosclerotic lesions in the vascular wall are associated with an enhanced risk of cardiovascular events. The extent of calcification can be assessed with sensitive non-invasive methods, even before clinical signs and symptoms occur. The underlying mineralization process of the vascular wall involves cells, cytokines, and signaling pathways that are reminiscent of the mineralization process in bone. RANKL, its receptor RANK, and the decoy receptor OPG represent a crucial cytokine system in osteoclast biology and bone resorption. OPG is secreted by bone cells and cells of the immune and vascular system, and it may represent a crucial link between the skeleton and the vascular system in vascular calcification since OPG^{-/-}-mice display a phenotype of both osteoporosis and vascular calcification.

The maintenance of vascular homeostasis is critically dependent of the continued integrity of vascular endothelial cell function. A key event in the early development of atherosclerosis is assumed to be endothelial cell dysfunction. To study whether and how T_H2-cytokines IL-4 and IL-13 modulate the expression of OPG in endothelial cells, primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used, which represent an established model of endothelial cell biology. The aim of this research project was to study the involved signaling pathways, and whether endothelial OPG can control differentiation and activation of osteoclasts.

First, the regulation of endothelial OPG expression by humoral factors that have been implicated in vascular disease, such as IL-4 and IL-13, were assessed *in vitro*. Analysis of endothelial OPG mRNA levels by Northern blot and of OPG protein secretion by ELISA showed a dose- and time-dependent enhancement of OPG mRNA and protein expression by 3- to 4-fold by IL-4 and IL-13. Addition of soluble IL-4-receptor completely abrogated this effect. IL-4- and IL-13-induced up regulation of OPG expression was dependent on the phosphorylation of

STAT6. Inhibition of phospholipase C which is necessary for STAT6 phosphorylation specifically blocked IL-4 induced OPG-expression. These results show evidence of the sequential signaling pathway of IL-4 and IL-13 through IL-4-receptor and STAT6 in regulating endothelial OPG expression.

Second, the paracrine interactions between human endothelial cells and osteoclast precursor cells were evaluated. Experiments were performed to test the hypothesis that endothelial cell-derived OPG regulates osteoclast differentiation and activation. A functional osteoclast resorption assay was established and validated to quantify these effects. This osteoclast assay measures both the differentiation and the activation of human osteoclasts. T_H2-cytokines IL-4 and IL-13 directly inhibited osteoclast activity dose-dependently down to 13 %, roughly one order of magnitude. Conditioned medium of endothelial cells after exposure to IL-4 or IL-13 showed a paracrine inhibition of osteoclast activity. This effect was dependent on the previously employed cytokine dose. The paracrine inhibition of osteoclast activity by medium transfer of non-stimulated HUVEC could be completely abrogated by a neutralizing OPG antibody but not by an unspecific control antibody. Thus, OPG represents the major paracrine factor for inhibition of osteoclast activity by endothelial cells. This inhibitory effect could be partially attenuated by neutralizing OPG antibody after prior IL-4-exposure of HUVEC. This indicates that osteoclastogenic factors other than OPG are released by endothelial cells after IL-4 exposure.

In conclusion, IL-4 and IL-13 stimulate OPG production in HUVEC via STAT6 activation. Endothelial cell-derived OPG specifically inhibits osteoclast activity. Collectively, these data highlight the importance of OPG as an essential common mediator of vascular and bone biology. The inhibition of osteoclast activity by OPG may promote vascular calcification since mineralized deposits may not be appropriately removed from the vascular wall.

8. Literaturverzeichnis

- Abedin M, Omland T, Ueland T, Khera A, Aukrust P, Murphy SA, Jain T, Gruntmanis U, McGuire DK, de Lemos JA. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am J Cardiol* 2007;99:513-518.
- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004a;24:1161–1170.
- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells in the artery wall. *Circ Res* 2004b;95:671-676.
- Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF- κ B. *J Clin Invest* 2001;107:1375-1385.
- Ahlen J, Andersson S, Mukohyama H, Roth C, Backman A, Conaway HH, Lerner UH. Characterization of the bone-resorptive effect of interleukin-11 in cultured mouse calvarial bones. *Bone* 2002;31:242-251.
- Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, Jaffer FA, Aikawa M, Weissleder R. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 2007;116:2841-2850.
- Alam AS, Gallagher A, Shankar V, Ghatei MA, Datta HK, Huang CL, Moonga BS, Chambers TJ, Bloom SR, Zaidi M. Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology* 1992;130:3617-3624.
- Al-Fakhri N, Hofbauer LC, Preissner KT, Franke FE, Schoppet M. Expression of bone-regulating factors osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) in heterotopic vascular ossification. *Thromb Haemost* 2005;94:1335-1337.

- Ali AS, Lax AS, Liljestrom M, Paakkari I, Ashammakhi N, Kovanen PT, Konttinen YT. Mast cells in atherosclerosis as a source of the cytokine RANKL. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:672-674.
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1977;74:5350-5354.
- American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *Bone* 2000;27:761-764.
- Amos RS, Wright V. Monckeberg's arteriosclerosis and metabolic bone disease. *Lancet* 1980;2:248-249.
- Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-179.
- Anderson KL, Smith KA, Perkin H, Hermanson G, Anderson CG, Jolly DJ, Maki RA, Torbett BE. PU. 1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* 1999;94:2310-2318.
- Andrews RP, Ericksen MB, Cunningham CM, Daines MO, Hershey GK. Analysis of the life cycle of STAT6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. *J Biol Chem* 2002;277:36563-365639.
- Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) receptors. *J Exp Med* 1999;190:1741-1754.

- Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007;40:251-264.
- Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, Solus JF, Avalos I, Gebretsadik T, Shintani A, Raggi P, Sokka T, Pincus T, Stein CM. Serum osteoprotegerin is increased and independently associated with coronary-artery atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2007;195:135-141.
- Avbersek-Luznik I, Malesic I, Rus I, Marc J. Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1019-1023.
- Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 2000;275:4858-4864.
- Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998;17:3261-3270.
- Baldini V, Mastropasqua M, Francucci CM, D'Erasmus E. Cardiovascular disease and osteoporosis. *J Endocrinol Invest* 2005;28:69-72.
- Bendixen AC, Shevde NK, Dienger KM, Willson TM, Funk CD, Pike JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor γ 1. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2001;98:2443-2448.
- Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older apoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2117-2124.
- Bennett MR. Breaking the plaque: evidence for plaque rupture in animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:713-714.
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-2496.

- Bernstein CN, Sargent M, Leslie WD. Serum osteoprotegerin is increased in Crohn's disease: a population-based case control study. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:325-330.
- Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with high mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998; 31:607-617.
- Bonner WM. Autoradiograms: 35S and 32P. *Methods Enzymol* 1987;152:55-61.
- Boothby M, Mora AL, Aronica MA, Youn J, Sheller JR, Goenka S, Stephenson L. IL-4 signaling, gene transcription regulation, and the control of effector T cells. *Immunol Res* 2001;23:179-191.
- Bostrom K, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000;10:151-158.
- Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993;91:1800-1809.
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:2384-2397.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Brandstrom H, Stiger F, Lind L, Kahan T, Melhus H, Kindmark A. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene for osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:13-17.

- Brandstrom H, Bjorkman T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:831-835.
- Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:631-637.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-1268.
- Buergher L, Oppenheimer A. Bone formation in sclerotic arteries. *J Exp Med* 1908;10:354–367.
- Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL, Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001;142:3546-3553.
- Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, Major AS, McCaleb JL, Oates JA, Morrow JD, Fazio S, Linton MRF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient and C57BL/6 mice. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:443-452.
- Cappuccio FP, Meilahn E, Zmuda JM, Cauley JA. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 1999;354:971-975.
- Chagraoui H, Sabri S, Capron C, Villeval JL, Vainchenker W, Wendling F. Expression of osteoprotegerin mRNA and protein in murine megakaryocytes. *Exp Hematol* 2003;31:1081-1088.
- Chaisson ML, Branstetter DG, Derry JM, Armstrong AP, Tometsko ME, Takeda K, Akira S, Dougall WC. Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of κ B kinase α . *J Biol Chem* 2004;279:54841-54848.

- Chang K, Weiss D, Suo J, Vega JD, Giddens D, Taylor WR, Jo H. Bone morphogenic protein antagonists are coexpressed with bone morphogenic protein 4 in endothelial cells exposed to unstable flow in vitro in mouse aortas and in human coronary arteries. Role of bone morphogenic protein antagonists in inflammation and atherosclerosis *Circulation* 2007;116:1258-1266.
- Chen Q, Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K. Testosterone increases osteoprotegerin mRNA expression in mouse osteoblast cells. *Horm Metab Res* 2004;36:674-678.
- Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2002;62:1724-1731.
- Chikatsu N, Takeuchi Y, Fukumoto S, Yano K, Fujita N, Tsuruo T, Fujita T. Clonal endothelial cells produce humoral factors that inhibit osteoclast-like cell formation *in vitro*. *Endocr J* 2002;49:439-447.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DL, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 1996;274:990-992.
- Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998;17:1-52.
- Chung CP, Oeser A, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani AK, Sokka T, Pincus T, Avalos I, Stein CM. Increased coronary-artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: relationship to disease duration and cardiovascular risk factors. *Arthritis Rheum* 2005;52:3045-3053.
- Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 2006;12:1075-1080.

- Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F, Mehta JL. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:424-427.
- Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005;96:930-938.
- Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004;95:1046-1057.
- Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:20659-20672.
- Cotmore JM, Nichols Jr G, Wuthier RE. Phospholipid-calcium phosphate complex: enhanced calcium migration in the presence of phosphate. *Science* 1971;172:1339-1341
- Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor alpha, H₂O₂, and high intravascular pressure. *Circulation* 2005;111:2364-2372.
- Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MRF, Funk CD. Disruption of the 12/15-LOX gene diminish atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *J Clin Invest* 1999;103:1597-1604.
- Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Activation of NF- κ B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- κ B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem* 1999;274:7724-7731.
- Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998;273:20551-20555.

- Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 2003;163:1117-1125.
- Davies JM, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and Eselectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-229.
- Davies MJ. Going from immutable to mutable atherosclerotic plaques. *Am J Cardiol* 2001;88:2-9.
- David JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* 2002;115:4317-4325.
- Degli-Esposti M. To die or not to die: the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 1999;65:535-542.
- Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 2003;61:504-513.
- Demer LL. A skeleton in the atherosclerosis closet. *Circulation* 1995;92:2029-2032.
- Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1998-2003.
- Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, Shah PK, Rajavashisth TB. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocr Rev* 2004;25:629-672.

- Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2003;100:11201-11206.
- Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999;9:1-17.
- Doherty TM, Detrano RC, Mautner SL, Mautner GC, Shavelle RM. Coronary calcium: the good, the bad, and the uncertain. *Am Heart J* 1999;137:806-814.
- Doherty TM, Tang W, Detrano RC. Racial differences in the significance of coronary calcium in asymptomatic black and white subjects with coronary risk factors. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:787-794.
- Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res* 1998;13:828-838.
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-1504.
- Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 2004;110:3424-3429.
- Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int* 1994;54:268-273.
- Emery JG, McDonnell P, Brigham Burke M, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273:14363-14367.

- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-671.
- Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 2004;110:2226-2232.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132:6-13.
- Fijen JW, Zijlstra JG, De Boer P, Spanjersberg R, Tervaert JW, Van Der Werf TS, Ligtenberg JJ, Tulleken JE. Suppression of the clinical and cytokine response to endotoxin by RWJ-67657, a p38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor, in healthy human volunteers. *Clin Exp Immunol* 2001;124:16-20.
- Fiumara P, Snell V, Li Y, Mukhopadhyay A, Younes M, Gillenwater AM, Cabanillas F, Aggarwal BB, Younes A. Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 2001;98:2784-2790.
- Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003;289:187-193.
- Fox SW, Fuller K, Chambers TJ. Activation of osteoclasts by interleukin-1: Divergent divergent responsiveness in osteoclasts formed *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Physiol* 2000;184:334-340.
- Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997;11:3482-3496.
- Frostegård J. Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1776-1785.

- Fujii H, Takiuchi S, Kamide K, Horio T, Niizuma S, Tanaka N, Hashimoto S, Nakatani S, Fukagawa M, Kawano Y. Clinical implications of assessing coronary flow velocity reserve and plasma endothelin-1 in hypertensive patients. *Hypertens Res* 2005;28:911-916.
- Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale SD, Itonaga I, Torisu T, Athanasou NA. 2001 The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor- β , and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* 2001;28:261-267.
- Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A, McGee JO, Athanasou NA. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* 1996;137:4058-4060.
- Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998;273:34120-34127.
- Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone MA Jr, Falb D, Huszar D. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000;24:171-174.
- Gao Y-H, Shinki T, Yuase T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: Regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:697-702.
- Gardner CR. Morphological analysis of osteoclastogenesis induced by RANKL in mouse bone marrow cell cultures. *Cell Biol Int* 2007;31:672-682.

- Gayard P, Garcier JM, Boire JY, Ravel A, Perez N, Privat C, Lucien P, Viallet JF, Boyer L. Spiral CT quantification of aorto-renal calcification and its use in the detection of atheromatous renal artery stenosis: a study in 42 patients. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2000;23:17-21.
- Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-628.
- George J, Shoenfeld Y, Gilburd B, Afek A, Shaish A, Harats D. Requisite role for interleukin-4 in the acceleration of fatty streaks induced by heat shock protein 65 or *Mycobacterium tuberculosis*. *Circ Res* 2000;86:1203-1210.
- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15-23.
- Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2000;902:230-239.
- Glass KC, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001;104:503-516.
- Gochuico BR, Zhang J, Ma BY, Marshak-Rothstein A, Fine A. TRAIL expression in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:1045-1050.
- Goebeler M, Schnarr B, Toksoy A, Kunz M, Brocker EB, Duschl A, Gillitzer R. Interleukin-13 selectively induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion by human endothelial cells. Involvement of IL-4R alpha and Stat6 phosphorylation. *Immunology* 1997;91:450-457.
- Golledge J, McCann M, Mangan S, Lam A, Karan M. Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke* 2004;35:1636-1641.

- Green EA, Flavell RA. TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J Exp Med* 1999;189:1017-1020.
- Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA* 2004;291:210-215.
- Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 1999;72:7-29.
- Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. Interleukin-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* 1998;273:28670-28676.
- Guo W, Morrisett JD, DeBakey ME, Lawrie GM, Hamilton JA. Quantification in situ of crystalline cholesterol and calcium phosphate hydroxyapatite in human atherosclerotic plaques by solid-state magic angle spinning NMR. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1630-1636.
- Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1926-1931.
- Hall DJ, Bates ME, Guar L, Cronan M, Korpi N, Bertics PJ. The role of p38 MAPK in rhinovirus-induced monocyte chemoattractant protein-1 production by monocytic-lineage cells. *J Immunol* 2005;174:8056-8063.
- Hanson EM, Dickensheets H, Qu CK, Donnelly RP, Keegan AD. Regulation of the dephosphorylation of Stat6. Participation of Tyr-713 in the interleukin-4 receptor α , the tyrosine phosphatase SHP-1, and the proteasome. *J Biol Chem* 2003;278:3903-3911.

- Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, Rodan SB. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 1994;93:2490-2496.
- Harvey EJ, Li N, Ramji DP. Critical role for casein kinase 2 and phosphoinositide-3-kinase in the interferon- γ -induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other key genes implicated in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:806-812.
- Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, Duschl A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:173-188.
- Hilton MJ, Gutierrez L, Zhang L, Moreno PA, Reddy M, Brown N, Tan Y, Hill A, Wells DE. An integrated physical map of 8q22-q24: Use in positional cloning and deletion analysis of Langer-Giedion syndrome. *Genomics* 2001;71:192-199.
- Hirayama T, Dai S, Abbas S, Yamanaka Y, Abu-Amer Y. Inhibition of inflammatory bone erosion by constitutively active STAT-6 through blockade of JNK and NF-kappaB activation. *Arthritis Rheum* 2005;52:2719-2729.
- Hofbauer LC, Schrader J, Niebergall U, Viereck V, Burchert A, Hörsch D, Preissner KT, Schoppet M. Interleukin-4 differentially regulates osteoprotegerin expression and induces calcification in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2006;95:708-714.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292:490-495.
- Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 2002a;147:269-273.

- Hofbauer LC, Kluger S, Kuhne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppet M, Zielke A, Heufelder AE. Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem* 2002b;86:642-650.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001a;358:257-259.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001b;79:243-253.
- Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin. Potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 2001c;92:460-470.
- Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T, Khosla S. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001d;280:334-339.
- Hofbauer LC, Khosla S, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999a;140:4382-4389.
- Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999b;25:255-259.

- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999c;140:4367-4370.
- Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:776-781.
- Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 1998;139:4743-4746.
- Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 2005;97:105-114.
- Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan H-L, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia X-Z, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1999;96:3540-3545.
- Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nature Genet* 2000;24:45-48.
- Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Hata K, Reddy SV, Yoneda T. Activation of NFAT signal *in vivo* leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *J Immunol* 2006;177:2384-2390.
- Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001;142:1419-1426.

- Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch* 1998;433:559-65.
- Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE. Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: associations with mast cells and macrophages. *J Pathol* 1998;185:10-17.
- Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, Suda T. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* 1999;257:719-723.
- Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in *NPPI^{-/-}* mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:686-691.
- Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification. Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006;99:1044-1059.
- Jono S, Ikari Y, Shioi A, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:1192-1194.
- Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000;87:10-17.
- Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* 1999;162:2562-2568.
- Ju H, Behm DJ, Nerurkar S, Eybye ME, Haimbach RE, Olzinski AR, Douglas SA, Willette RN. p38 MAPK inhibitors ameliorate target organ damage in hypertension: Part 1. p38 MAPK-dependent endothelial dysfunction and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:932-938.

- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggrefe M. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:57-66.
- Kado DM, Browner WS, Blackwell T, Gore R, Cummings SR. Rate of bone loss is associated with mortality in older women: a prospective study. *J Bone Miner Res* 2000;15:1974-1980.
- Kadoglou NPE, Gerasimidis T, Golemati S, Kapelouzou A, Karayannacos PE, Liapis CD. The relationship between serum levels of vascular calcification inhibitors and carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg* 2008;47:55-62.
- Kamel Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Hounoki H, Taki H, Maruyama M, Miyahara T, Kobayashi M. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced expression of NFATc1 and c-Fos: a possible mechanism for downregulation of osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:839-845.
- Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature* 2003;423:316–318.
- Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JMW, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskkeletal tissues. *Bone* 1999;25:525-534.
- Kasono K, Sato K, Sato Y, Tsushima T, Shizume K, Demura H. Inhibitory effect of interleukin-4 on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow culture. *Bone Miner* 1993;21:179-188.
- Kawaguchi H, Nemoto K, Raisz LG, Harrison JR, Voznesensky OS, Alander CB, Pilbeam CC. Interleukin-4 inhibits prostaglandin G/H synthase-2 and cytosolic phospholipase A₂ induction in neonatal mouse parietal bone cultures. *J Bone Miner Res* 1996;11:358-366.

- Keegan AD, Johnston JA, Tortolani PJ, McReynolds LJ, Kinzer C, O'Shea JJ, Paul WE. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: analysis of Janus kinase activation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995;92:7681-7685.
- Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* 2003;300:1527-1528.
- Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2000;23:295-303.
- Kettler M, Westenfeld R, Schlieper G, Brandenburg V. Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 2005;9:265-270.
- Khew-Goodall Y, Wadham C, Stein BN, Gamble JR, Vadas MA. Stat6 activation is essential for interleukin-4 induction of P-selectin transcription in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1421-1429.
- Kiechl S, Schett G, Schwaiger J, Seppi K, Eder P, Egger G, Santer P, Mayr A, Xu Q, Willeit J. Soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation* 2007;116:385-391.
- Kiechl S, Werner P, Knofloch M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The Osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4:801-811.
- Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, Santer P, Smolen J, Poewe W, Willeit J. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109:2175-2180.
- Kim HH, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim JH, Lee HJ, Lee MS, Lee ZH, Koh GY. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J* 2003;17:2163-2165.

- Kim Y, Sato K, Asagiri M, Morita I, Soma K, Takayanagi H. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2005;280:32905-32913.
- King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:456-461.
- Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANSE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta* 1999;1445:134-141.
- Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 1999;191:275-286.
- Kodaira K, Kodaira K, Mizuno A, Yasuda H, Shima N, Murakami A, Ueda M, Higashio K. Cloning and characterization of the gene encoding mouse osteoclast differentiation factor. *Gene* 1999;230:121-127.
- Koh JM, Park BL, Kim DJ, Kim GS, Cheong HS, Kim TH, Hong JM, Shin HI, Park EK, Kim SY, Shin HD. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007;18:323-331.
- Kong Y-Y, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: A regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 2000;21:495-502.

- Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H-L, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliviera-Dos Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999a;397:315-323.
- Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999b;402:304-309.
- Koshla S. The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology*. 2001;142:5050-5055.
- Kumar S, Boehm J, Lee JC. P38 MAP kinases: Key signaling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:717-726.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45-51.
- Kwon BS, Wang S, Udagawa N, Haridas V, Lee ZH, Kim KK, Oh K-O, Greene J, Li Y, Su J, Gentz R, Aggarwal BB, Ni J. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J* 1998;12:845-854.
- Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian Y-X, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Lee C-K, Lee EY, Chung SM, Mun SH, Yoo B, Moon H-B. Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor- κ B, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Arthritis Rheum* 2004c;50:3831-3843.
- Lee SE, Woo KM, Kim SY, Kim HM, Kwack K, Lee ZH, Kim HH. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* 2002;30:71-77.
- Lee SY, Kaufmann DR, Mora AL, Santana A, Boothby M, Choi Y. Stimulus-dependent synergism of the antiapoptotic tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) and nuclear factor- κ B pathways. *J Exp Med* 1998;188:1381-1384.
- Lee YW, Hirani AA. Role of interleukin-4 in atherosclerosis. *Arch Pharm Res* 2006;29:1-15.
- Lee YW, Eum SY, Nath A, Toborek M. Estrogen mediated protection against HIV Tat protein-induced inflammatory pathways in human vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2004a;63:139-148.
- Lee YW, Eum SY, Chen KC, Hennig B, Toborek M. Gene expression profile in interleukin-4-stimulated human vascular endothelial cells. *Mol Med* 2004b;10:19-27.
- Lee YW, Hennig B, Toborek M. Redox-regulated mechanisms of IL-4-induced MCP-1 expression in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:185-192.
- Lee YW, Hennig B, Fiala M, Kim KS, Toborek M. Cocaine activates redox-regulated transcription factors and induces TNF- α expression in human brain endothelial cells. *Brain Res* 2001a;920:125-133.

- Lee YW, Hennig B, Yao J, Toborek M. Methamphetamine induces AP-1 and NF- κ B binding and transactivation in human brain endothelial cells. *J Neurosci Res* 2001b;66:583-591.
- Lee YW, Kühn H, Hennig B, Daugherty A, Toborek M. Interleukin-4 induces transcription of the 15-lipoxygenase-I gene in human endothelial cells. *J. Lipid Res* 2001c;42:783-791.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtke H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 1977;16:4743-4751.
- Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:978-983.
- Lerner UH, Johansson L, Ransjö M, Rosenquist JB, Reinholt FP, Grubb A. Cystatin C, an inhibitor of bone resorption produced by osteoblasts. *Acta Physiol Scand* 1997;161:81-92.
- Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol* 2000;19:107-120
- Li J, Sarosi I, Yan X-Q, Morony S, Capparelli C, Tan H-L, McCabe SM, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan S-C, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2000;97:1566-1571.
- Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372.
- Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* 1999;353:89-92.

- Lomaga MA, Yeh W-C, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heide A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6-deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40 and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13:1015-1024.
- Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, van Den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-De Roo CJ, Richards CD, Miossec P, van Den Berg WB. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest* 2000;105:1697-1710.
- Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlöndorff J, Tempst P, Choi Y, Blobel CP. Evidence for a role of a tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 1999;274:13613-13618.
- Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78–81.
- Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 2006;21:1648-1656.
- Makhluf HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:669-672.
- Mallick HA, Berlyne GM. Arterial calcification after vitamin-D therapy in hyperphosphatemic renal failure. *Lancet* 1968;2:1316-1320.

- Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an $\alpha_v\beta_3$ -induced, NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:20959-20962.
- Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF- κ B and Ca^{2+} signaling. *J Immunol* 2005;175:917-925.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115-137.
- Matayoshi A, Brown C, DiPersio JF, Haug J, Abu-Amer Y, Liapis H, Kuestner R, Pacifici R. Human blood-mobilized hematopoietic precursors differentiate into osteoclasts in the absence of stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10785-10790.
- Matsubara T, Myoui A, Ikeda F, Hata K, Yoshikawa H, Nishimura R, Yoneda T. Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab* 2006;24:368-372.
- Matsuo K, Owens JM, Tonko M, Elliott C, Chambers TJ, Wagner EF. Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nature Genet* 2000;24:184-187.
- Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Toyama Y, Yabe Y, Higashio K, Suda T. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:199-204.
- McGowan NW, Walker EJ, Macpherson H, Ralston SH, Helfrich MH. Cytokine-activated endothelium recruits osteoclast precursors. *Endocrinology* 2001;142:1678-1681.

- MacIntyre I, Zaidi M, Alam AS, Datta HK, Moonga BS, Lidbury PS, Hecker M, Vane JR. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2936-2940.
- Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 1984;138:267-284.
- Merewether LA, Le J, Jones MD, Lee R, Shimamoto G, Lu HS. Development of disulfide peptide mapping and determination of disulfide structure of recombinant human osteoprotegerin chimera produced in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 2000;375:101-110.
- Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000;192:463-474.
- Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood* 2007;109:1495-1502.
- Min JK, Kim YM, Kim EC, Kim EC, Gho YS, Kang IJ, Lee SY, Kong YY, Kwon YG. Vascular endothelial growth factor upregulates expression of receptor activator of NF- κ B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J Biol Chem* 2003;278:39548-39557.
- Miossec P, Chomarat P, Dechanet J, Moreau JF, Roux JP, Delmas P, Banchereau J. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:1715-1722.

- Mizuno A, Murakami A, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin gene and its expression in embryogenesis. *Gene* 1998a;215:339-343.
- Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998b;247:610-615
- Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31:509-519.
- Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 2003;63:1003-1011.
- Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002;61:638-647.
- Mönckeberg JG. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1903;171:141-167.
- Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, Stolina M, Kostenuik PJ, Demer LL. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr^(-/-)* mice. *Circulation* 2008;117:411-420.
- Moran CS, McCann M, Karan M, Norman P, Ketheesan N, Golledge J. Association of osteoprotegerin with human abdominal aortic aneurysm progression. *Circulation* 2005;111:3119-3125.

- Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, Tondravi M. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood* 2003;102:1078-1086.
- Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem* 1998;254:685-691.
- Myers DE, Collier FM, Minkin C, Wang H, Holloway WR, Malakellis M, Nicholson GC. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett* 1999;463:295-300.
- Nabeshima Y, Imura H. α -Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. *Am J Nephrol* 2008;28:455-464.
- Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:532-536.
- Nagasaki T, Inaba M, Jono S, Hiura Y, Tahara H, Shirakawa K, Onoda N, Ishikawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Increased levels of serum osteoprotegerin in hypothyroid patients and its normalization with restoration of normal thyroid function. *Eur J Endocrinol* 2005;152:347-353.
- Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:395-400.
- Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y, Nakamura M, Yamamoto Y, Yamashita T, Mizoguchi T, Sato M, Mogi M, Penninger JM, Takahashi N. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF- κ B ligand derived from osteoblasts. *J Immunol* 2007;178:192-200.

- Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2004;50:2450-2458.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29.
- Napoli C, D'Arminento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia; intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680-2690.
- Nardelli B, Zaritskaya L, McAuliffe W, Ni Y, Lincoln C, Cho YH, Birse CE, Halpern W, Ullrich S, Moore PA. Osteostat/tumor necrosis factor superfamily 18 inhibits osteoclastogenesis and is selectively expressed by vascular endothelial cells. *Endocrinology* 2006;147:70-78.
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999;17:701-738.
- Ogawa T, Ishida-Kitagawa N, Tanaka A, Matsumoto T, Hirouchi T, Akimaru M, Tanihara M, Yogo K, Takeya T. A novel role of L-serine (L-Ser) for the expression of nuclear factor of activated T cells (NFAT)2 in receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis *in vitro*. *J Bone Miner Metab* 2006;24:373-379.
- Olesen P, Ledet T, Rasmussen LM. Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF- α . *Diabetologia* 2005;48:561-568.

- Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, Seo H, Ohta H, Nozawa S, Kudo I, Suda T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol* 1996;156:758-764.
- Onyia JE, Miles RR, Yang X, Halladay DL, Hale J, Glasenbrook A, McClure D, Seno G, Churgay L, Chandrasekhar S, Martin TJ. *In vivo* demonstration that parathyroid hormone 1-38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res* 2000;15:863-871.
- Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, Sugihara M, Honda H, Kawamata S, Mito S, Soe NN, Yoshizumi M. Role of osteoprotegerin in arterial calcification: development of new animal model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2058-2064.
- Palmer-Crocker RL, Hughes CC, Pober JS. IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the γ c chain. *J Clin Invest* 1996;98:604-609.
- Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, Conaway HH, Lerner UH. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem* 2006;281:2414-2429.
- Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002;169:3353-3362.
- Parfitt AM. The mechanism of coupling: A role for the vasculature. *Bone* 2000;26:319-323.

- Pernis AB, Rothman PB. JAK-STAT signaling in asthma. *J Clin Invest* 2002;109:1279-1283.
- Pettersen I, Bakkelund W, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 2005;25:3809-3816.
- Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ, Doiron K, Marceau AA. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R25.
- Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1610-1616.
- Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell* 2004;15:2834-2841.
- Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification *in vitro*: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000;87:1055-1062.
- Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:145-152.
- Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005;115:3318-3325.
- Rasmussen LM, Tarnow L, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A. Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *Eur J Endocrinol* 2006;154:75-81.
- Rasmussen LM, Ledet T. Osteoprotegerin and diabetic macroangiopathy. *Horm Metab Res* 2005;1:90-94.

- Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of apoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1420-1425.
- Renkema KY, Alexander RT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Calcium and phosphate homeostasis: Concerted interplay of new regulators. *Ann Med* 2008;40:82-91.
- Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2857-2867.
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-928.
- Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996;17:308-332.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999. 340;115-126.
- Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Hohne W, Schauer G, Lehmann M, Roscioli T, Schnabel D, Epplen JT, Knisely A, Superti-Furga A, McGill J, Filippone M, Sinaiko AR, Vallance H, Hinrichs B, Smith W, Ferre M, Terkeltaub R, Nurnberg P. Mutations in ENPP1 are associated with ‘idiopathic’ infantile arterial calcification. *Nat Genet* 2003;34:379-381.
- Saccani S, Pantano S, Natoli G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. *Nat Immunol* 2002;3:69-75.

- Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H, Kurihara H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1486-1492.
- Sambrook PN, Cohen ML, Eisman JA, Pocock NA, Champion GD, Yeates MG. Effects of low dose corticosteroids on bone mass in rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 1989;48:535-538.
- Sandberg WJ, Yndestad A, Oie E, Smith C, Ueland T, Ovchinnikova O, Robertson AK, Muller F, Semb AG, Scholz H, Andreassen AK, Gullestad L, Damas JK, Froland SS, Hansson GK, Halvorsen B, Aukrust P. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:857-863.
- Sasaguri T, Arima N, Tanimoto A, Shimajiri S, Hamada T, Sasaguri Y. A role for interleukin 4 in production of matrix metalloproteinase 1 by human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1998;138:247-253.
- Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnke-Dechent W. The serum protein α_2 -Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003;112:357-366.
- Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet* 1999;21:150-151.
- Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF- κ B ligand. *J Biol Chem* 2005;280:41155-41164.
- Schoppet M, Henser S, Ruppert V, Stubig T, Al-Fakhri N, Maisch B, Hofbauer LC. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF- κ B-dependent. *J Cell Biochem* 2007;100:1430-1439.

- Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT, Hofbauer LC. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4104-4112.
- Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:549-553.
- Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1024-1028.
- Schrijvers DM, Meyer GRY, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 2007;73:470-480.
- Seta N, Okazaki Y, Kuwana M. Human circulating monocytes can express receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and differentiate into functional osteoclasts without exogenous stimulation. *Immunol Cell Biol* 2008. Im Druck befindlich.
- Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, Manoukian R, Kelley M, Hawkins N, Davy E, Shimamoto G, Beck J, Kaufman SA, Van G, Scully S, Qi M, Grisanti M, Dunstan C, Boyle WJ, Lacey DL. Characterization of osteoclast precursors in human blood. *Br J Haematol* 2000;111:501-512.
- Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100:2168-2176.

- Shiba H, Nakanishi K, Sakata M, Fujita T, Uchida Y, Kurihara H. Effects of ageing on proliferative ability, and the expressions of secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) and osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human periodontal ligament cells. *Mech Ageing Dev* 2000;117:69-77.
- Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004;113:561-568.
- Shin V, Zebboudj AF, Bostrom K. Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res* 2004;41:193-201.
- Silfverswärd CJ, Larsson S, Ohlsson C, Frost A, Nilsson O. Reduced cortical bone mass in mice with inactivation of interleukin-4 and interleukin-13. *J Orthop Res* 2007;25:725-731.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Amgen EST Program, Boyle WJ. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.
- Skrtic D, Eanes ED. Membrane-mediated precipitation of calcium phosphate in model liposomes with matrix vesicle-like lipid composition. *Bone Miner* 1992;16:109-119.
- Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith DA, Boyd NL, Platt MO, Lassegue B, Griendling KK, Jo H. Bone Morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res* 2004;95:773-779.

- Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, Boyd N, Boo YC, Vega JD, Taylor WR, Jo H. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *J Biol Chem* 2003;278:31128-31135.
- Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC, Schaefer JR. Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3764-3768.
- Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification *in vivo*. *J Exp Med* 2002;196:1047-1055.
- Spicer SS, Lewis SE, Tashian RE, Schulte BA. Mice carrying a CAR-2 null allele lack carbonic anhydrase II immunohistochemically and show vascular calcification. *Am J Pathol* 1989;134:947-954.
- Strong JP. Landmark perspective: Coronary atherosclerosis in soldiers. A clue to the natural history of atherosclerosis in the young. *JAMA* 1986;256:2863-2866.
- Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E₂ is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol* 2004;172:2504-2510.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-357.
- Szule P, Hofbauer LC, Heufelder AE, Roth S, Delmas PD. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3162-3165.

- Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* 2002;35:179-203.
- Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 2005;83:170-179.
- Takayanagi H, Iizuka H, Hideharu J, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43: 259-269.
- Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J, Moore G, Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997;204:35-46.
- Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Nakano A, Takeuchi K, Kitazoe K, Kido S, Inoue D, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Matsumoto T. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and Osteopontin. *Clin Cancer Res* 2007;13:816-823.
- Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;172:173-177.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-1508.
- Teitelbaum SL. Osteoclasts?, culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:201-208.

- Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor- β (TGF- β): Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF- β effects. *J Biol Chem* 2001;276:36241-36250.
- Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. The osteoblast-specific transcription factor cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem* 2000;275:25163-25172.
- Thomas PS. Hybridisation of denatured RNA and small DNA-fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1980;77:5201-5205.
- Tintut Y, Demer LL. Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:555-560.
- Takeda K, Kishimoto T, Akira S. STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J Mol Med* 1997;75:317-326.
- Toborek M, Lee YW, Garrido R, Kaiser S, Hennig B. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2002;75:119-125.
- Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999;94:295-314.
- Tomazic BB. Physiochemical principles of cardiovascular calcification. *Z Kardiol* 2001;90:68-80.
- Tomoyasu A, Goto M, Fujise N, Mochizuki S, Yasuda H, Morinaga T, Tsuda E, Higashio K. Characterization of monomeric and homodimeric forms of osteoclastogenesis inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:382-387.

- Top C, Cankir Z, Silit E, Yildirim S, Danaci M. Monckeberg's sclerosis: an unusual presentation - a case report. *Angiology* 2002;53:483-486.
- Towler DA. Inorganic pyrophosphate: a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:651-654.
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:137-142.
- Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, et al. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:489-494.
- Ueland T, Jemtland R, Godang K, Kjekshus J, Hognestad A, Omland T, Squire IB, Gullestad L, Bollerslev J, Dickstein K, Aukrust P. Prognostic value of osteoprotegerin in heart failure after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1970-1976.
- Ueno K, Katayama T, Miyamoto T, Koshihara Y. Interleukin-4 enhances *in vitro* mineralization in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1521-1526.
- Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;286:686-696.
- Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. The Role of RANK/RANKL/OPG: Clinical Implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4514-4521.
- Vidal NOA, Brändström H, Jonsson KB, Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: Down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* 1998a;159:191-195.

- Vidal ON, Sjögren K, Eriksson BI, Ljunggren Ö, Ohlsson C. Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 α in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998b;248:696-700.
- Virmani R, Ladich ER, Burke AP, Kolodgie FD. Histopathology of carotid atherosclerotic disease. *Neurosurgery* 2006;59:219-227
- Walch L, Massade L, Dufilho M, Brunet A, Rendu F. Pro-atherogenic effect of interleukin-4 in endothelial cells: modulation of oxidative stress, nitric oxide and monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Atherosclerosis* 2006;187:285-291.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO* 1997;16:5386-5397.
- Wang MW-H, Wei S, Faccio R, Takeshita S, Tebas P, Powderly WG, Teitelbaum SL, Ross FP. The HIV protease inhibitor ritonavir blocks osteoclastogenesis and function by impairing RANKL-induced signaling. *J Clin Invest* 2004;114:206-213.
- Warrington KJ, Kent PD, Frye RL, Lymp JF, Kopecky SL, Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study. *Arthritis Res Ther* 2005;7:984-991.
- Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF- β_1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 1994;93:2106-2113.
- Wei M, Esbaei K, Bargman J, Oreopoulos DG. Relationship between serum magnesium, parathyroid hormone, and vascular calcification in patients on dialysis: a literature review. *Perit Dial Int* 2006;26:366-373.

- Westra J, Kuldo JM, van Rijswijk MH, Molema G, Limburg PC. Chemokine production and E-selectin expression in activated endothelial cells are inhibited by p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) inhibitor RWJ 67657. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1259-1269.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-682.
- Wilkinson FL, Liu Y, Rucka AK, Jeziorska M, Hoyland JA, Heagerty AM, Canfield AE, Alexander MY. Contribution of VCAF-positive cells to neovascularization and calcification in atherosclerotic plaque development. *J Pathol* 2007;211:362–369.
- Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskia M, Hanafusa H, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 1999a;4:1041–1049.
- Wong BR, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leuko Biol* 1999b;65:715-724.
- Wong BR, Lee SY, Vologodskia M, Steinman RM, Choi Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998;273:28335-28359.
- Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997a;186:2075-2080.
- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, Frankel WN, Young Lee S, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997b;272:25190-25194.

- Wong M, Toh L, Wilson A, Rowley K, Karschikus C, Prior D, Romas E, Clemens L, Dragicevic G, Harianto H, Wicks I, McColl G, Best J, Jenkins A. Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis Rheum* 2003;48:81-89.
- Xu J, Tan JW, Huang L, Gao XH, Laird R, Liu D, Wysocki S, Zheng MH. Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of NF- κ B ligand. *J Bone Miner Res* 2000;15:2178-2186.
- Yamada A, Takami M, Kawawa T, Yasuhara R, Zhao B, Mochizuki A, Miyamoto Y, Eto T, Yasuda H, Nakamichi Y, Kim N, Katagiri T, Suda T, Kamijo R. Interleukin-4 inhibition of osteoclast differentiation is stronger than that of interleukin-13 and they are equivalent for induction of osteoprotegerin production from osteoblasts. *Immunology* 2007;120:573-579.
- Yamaguchi S, Yamada Y, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Ichihara S, Kato K, Kameyama T, Yokoi K, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Nozawa Y. Genetic risk for atherothrombotic cerebral infarction in individuals stratified by sex or conventional risk factors for atherosclerosis. *Int J Mol Med* 2006;18:871-883.
- Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Chihara K. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr J* 2002;49:211-217.
- Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998;273:5117-5123.
- Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001;107:135-142.

- Yamane T, Kunisada T, Yamazaki H, Nakano T, Orkin SH, Hayashi SI. Sequential requirements for SCL/tal-1, GATA-2, macrophage colony-stimulating factor, and osteoclast differentiation factor/osteoprotegerin ligand in osteoclast development. *Exp Hematol* 2000;28:833-840.
- Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization *in vitro*. *Kidney Int.* 2004;66:2293-2299.
- Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclasto-genesis inhibitory factor: Increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14:518-527.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki S-I, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 1998a;139:1329-1337.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S-I, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1998b;95:3597-3602.
- Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol* 1998;161:6113-6121.
- Zamorano J, Rivas MD, Garcia-Trinidad A, Qu CK, Keegan AD. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity is necessary for the activation of STAT6. *J Immunol* 2003;171:4203-4209.

- Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, Gamble J, To LB, Findlay DM, Haynes DR. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol* 2005;204:714-723.
- Zauli G, Corallini F, Bossi F, Fischetti F, Durigutto P, Celeghini C, Tedesco F, Secchiero P. Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2007;110:536-543
- Zhang J, Fu M, Myles D, Zhu X, Du J, Cao X, Chen YE. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS Lett* 2002;521:180-184.
- Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, Mizokami A, Fu Z, Westman J, Keller ET. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 2001;107:1235-1244.
- Zhang JD, Cousens LS, Barr PJ, Sprang SR. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin-1 β . *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1991;88:3446-3450.
- Zhao Q, Shao J, Chen W, Li YP. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci* 2007;12:2519-2529.
- Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* 1998;101:1717-1725.

9. Anhang

9.1.

FACHBEREICH HUMANMEDIZIN

ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN

Abt. Innere Medizin mit Schwerpunkt

Gastroenterologie, Endokrinologie, Diabetologie

ZIM, Gastroenterologie/Stoffwechsel/Endokrinologie,
Postfach, 35033 Marburg



KLINIKUM der Philipps-Universität Marburg

PD Dr. med. Lorenz C. Hofbauer

Telefon: (06421) 286 2742

hofbauer@post.med.uni-marburg.de

Hausanschrift: Baldingerstraße, 35033
Marburg

Patientenaufklärung zum Projekt

- Osteoprotegerin-Expression in Endothelzellen -

In der Uni-Klinik Marburg werden Endothelzellen (Gefäßzellen) und ihre Rolle bei Gefäßerkrankungen untersucht. Dazu werden Endothelzellen aus Nabelschnüren verwendet, welche normalerweise nach der Entbindung abgetrennt und anschließend entsorgt werden. Durch Ihre Zustimmung unterstützen Sie, dass Endothelzellen aus der Nabelschnur zur medizinischen Forschung verwendet werden und dadurch neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Wissenschaftlicher Hintergrund:

Osteoprotegerin ist ein Botenstoff, der bei Erkrankungen des Knochens (z.B. Osteoporose) und der Gefäße (Herzinfarkt) eine bedeutende Rolle zu spielen scheint. Dieses Projekt untersucht den Zusammenhang zwischen Osteoprotegerin und der Entstehung von Gefäßerkrankungen. Durch diese Untersuchungen hoffen wir, die Entstehung dieser Erkrankungen besser zu verstehen und somit bessere Therapiemöglichkeiten zu finden.

Konzeption des Projektes:

Es werden Nabelschnüre von insgesamt 100 Patientinnen für dieses Projekt benötigt. Für die Patientin entsteht dadurch kein unmittelbarer Nutzen oder Schaden. Dieses Projekt nützt aber möglicherweise anderen Patientinnen durch das verbesserte Verständnis und die daraus entwickelten besseren Therapiemöglichkeiten.

Studiendurchführung:

Nach ihrem Einverständnis werden Endothelzellen aus der Nabelschnur gewonnen, die normalerweise mit dem Mutterkuchen entsorgt wird. Es ergeben sich weder für Ihr Kind noch für Sie als Patientin Nachteile oder zusätzliche Untersuchungen, Blutentnahmen, Klinikbesuche, Wiedereinbestellungen, körperliche Tests, Beantwortung von Fragebögen, telefonische Befragungen oder Hausbesuche. Falls bei Ihnen eine Nabelschnurblutspende oder eine Sammlung von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut erfolgen soll, so kann dies vor der Verwendung der Nabelschnur problemlos erfolgen. Nach Gewinnung der Gefäßzellen aus der Nabelschnur wird diese umgehend entsorgt.

Risiken und Nebenwirkungen:

Es ergeben sich weder für die Patientin, noch für ihr Kind Risiken oder Nebenwirkungen, da die Nabelschnur andernfalls entsorgt werden würde. Die Gewebeproben aus der Nabelschnur werden ausschließlich für wissenschaftliche Untersuchungen an der Uni-Klinik Marburg verwendet. Die Zellen oder das Material dieser Zellen werden nicht weitergegeben, veräußert oder kommerziell genutzt. Es erfolgt keine Stammzellforschung.

Für weitere Nachfragen zum Projekt und seiner Durchführung:

Verantwortlicher für dieses Projekt ist PD Dr. Lorenz C. Hofbauer (Kontakt s.o.)

Die Einverständniserklärung erfolgt freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere Behandlung rückgängig gemacht werden.

Bestätigung der Vertraulichkeit:

Es erfolgt die Beachtung der ärztlichen Schweigepflicht und der vertrauliche Umgang mit allen Daten. Diese Daten werden in anonymisierter Form (fortlaufende Nummer) gespeichert, wobei die Beachtung des Datenschutzgesetzes gewährleistet wird und keine Re-Identifizierung möglich ist.

Mit freundlichen Grüßen, PD Dr. Lorenz Hofbauer

9.2.

FACHBEREICH HUMANMEDIZIN

ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN
Abt. Innere Medizin mit Schwerpunkt
Gastroenterologie, Endokrinologie, Diabetologie
 ZIM, Gastroenterologie/Stoffwechsel/Endokrinologie,
 Postfach, 35033 Marburg


KLINIKUM
 der Philipps-Universität
 Marburg

PD Dr. med. Lorenz C. Hofbauer
 Telefon: (06421) 286 2742
 hofbauer@post.med.uni-marburg.de
 Hausanschrift: Baldingerstraße, 35033
 Marburg

Patientinnenaufkleber

Patienteneinverständniserklärung zum Projekt
- Osteoprotegerin-Expression in Endothelzellen -

Wir wurden von unserem Arzt vollständig über Wesen, Bedeutung und Tragweite des wissenschaftlichen Projektes mit dem o.g. Titel aufgeklärt. Wir haben den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Wir hatten die Möglichkeit, Fragen zu stellen und haben die Antworten verstanden und akzeptieren sie. Unser Arzt hat uns über die mit der Teilnahme an diesem Projekt verbundenen Risiken und den Nutzen informiert.

Wir hatten ausreichend Zeit, uns zur Teilnahme an diesem Projekt zu entscheiden und wissen, dass die Teilnahme freiwillig ist. Wir wissen, dass wir jederzeit und ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen können, ohne dass sich dieser Entschluss nachteilig auf die spätere Behandlung auswirken wird.

Uns ist bekannt, dass unsere Daten in verschlüsselter Form (fortlaufende Nummer) gespeichert werden, aus der keine Re-Identifizierung erfolgen kann.

Wir haben eine Kopie der Patienteninformation und dieser Einwilligung erhalten. Wir erklären hiermit unsere freiwillige Teilnahme an diesem wissenschaftlichen Projekt.

 Ort und Datum

 Unterschrift der Mutter

 Unterschrift des Vaters

 Ort und Datum

 Unterschrift der/des aufklärenden Ärztin/Hebamme/Arztes

9.3. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lorenz C. Hofbauer für die intensive wissenschaftliche Betreuung und motivierende Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit und seine stets konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Arnold, ehemaliger Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie des Universitätsklinikums Marburg und Herrn Prof. Dr. Thomas Mathias Gress, derzeitiger Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie des Universitätsklinikums Marburg und Gießen, Standort Marburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Einrichtungen ihres Institutes zu verwirklichen.

Der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Ute Niebergall sei für die hervorragende Einarbeitung und die Assistenz bei den experimentellen Arbeiten sowie für die beständige moralische Unterstützung gedankt. Bei Frau Carmen Kreutzmann bedanke ich mich für die gute Einarbeitung in die HUVEC-Kultivierung und ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft. Herrn PD Dr. Michael Schoppet danke ich für die konstruktive Kritik bei der Anfertigung meiner Dissertation und der Publikation. Frau Dr. Claudia Götsch danke ich für ihr Mitwirken an der Publikation.

Herrn Prof. Dr. Stephan Schmidt, Direktor der Klinik für Geburtshilfe und Perinatalmedizin des Universitätsklinikums Marburg und Gießen, Standort Marburg und Frau Dr. Riemer, Chefärztin der gynäkologischen Abteilung des Diakonie-Krankenhauses Wehrda sowie insbesondere Dr. Lars Hellmeyer und den Hebammen dieser Kliniken danke ich für die Kooperation bei der Gewinnung von Nabelschnüren für dieses Projekt.

Herrn Dr. Holger Garn des Institutes für Immunologie des Universitätsklinikums Marburg und Gießen, Standort Marburg danke ich für seine Unterstützung bei den fluorimetrischen Messungen.

9.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren

in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Baumann, Behr, Bien, Boekhoff, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Donner-Banzhoff, Dünne, Duda, Elsässer, Feiber, Gemsa, Gerdes, Göke, Görg C., Gress, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hertl, Hofbauer, Jungclas, Kann, Kalder, König, Kill, Klose, Kolb-Niemann, Koolman, Krieg, Kroll, Kühnert, Lankat-Buttgereit, Lill, Löffler, Lohoff, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller HH, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rothmund, Sattler, Schäfer H, Scherag, Schnabel, Schoppet, Seitz, Steiniger, Trebst, Vogelmeier, Weihe, Werner, Wulf